

Charakterisierung der P2Y₁-Rezeptor-defizienten Maus
Untersuchungen der cholinergen, GABAergen und glutamatergen
Neurotransmission

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von Laura Anna Vogt
geboren am 14.08.1982 in Rüsselsheim

angefertigt am
Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie und am
Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung

der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. habil. Reinhard Schliebs
Dr. rer. nat. Ute Krügel

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 24.01.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der P2Y- Rezeptor	1
1.1.1	Klassifikation	1
1.1.2	Struktur von P2Y-Rezeptoren und ihre Verteilung im Hirn	2
1.1.3	Funktionen des P2Y ₁ -Rezeptor im ZNS	5
1.2	Der P2Y ₁ -Rezeptor und cholinerge Neurotransmission.....	8
2	Problemstellung.....	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Chemikalien.....	13
3.1.1	Radiochemikalien	13
3.1.2	Verwendete Antikörper	13
3.2	Geräte	13
3.3	Versuchstiere	13
3.4	Aufarbeitung des Hirngewebes	15
3.4.1	Präparation.....	15
3.4.2	Anfertigung von Hirnschnitten.....	15
3.4.3	Anfertigung von Hirnhomogenaten.....	16
3.5	Rezeptorautoradiographie	16
3.5.1	Prinzip der Rezeptorautoradiographie.....	16
3.5.2	Durchführung der Rezeptorautoradiographie.....	17
3.5.3	Auswertung der Autoradiogramme	19
3.6	Histochemischer Nachweis der Acetylcholinesterase-Aktivität	21
3.7	Bestimmung der Acetylcholinesterase (AChE)-Aktivität	22
3.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	23
3.9	Bestimmung der Cholinacetyltransferase (ChAT)-Aktivität	23
3.10	Bestimmung der Glutathionperoxidase (GPx)-Aktivität.....	25
3.11	Bestimmung der reaktiven N-Spezies (NO, Nitrit)	26
3.12	Western Blot-Analyse zur Erfassung des Amyloidvorläuferproteins (APP)	28
3.12.1	Gewebeaufbereitung.....	28
3.12.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
3.12.3	Westernblotting und Immunodetektion.....	29
3.12.4	Auswertung der Immunblots	30
3.13	Statistische Analyse.....	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Das cholinerge Transmissionssystem.....	31
4.1.1	Die Acetylcholinesterase	31
4.1.2	Die Cholinacetyltransferase	35
4.1.3	M1-muskarinischer Acetylcholinrezeptor (M1-mAChR)	35
4.1.4	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor (nAChR).....	37
4.1.5	GABAerges Transmittersystem: GABA _A -Rezeptor	38
4.1.6	Glutamaterges Transmittersystem: NMDA-Rezeptor	40
4.2	Untersuchung von Biomarkern für oxidativen Stress	42
4.2.1	Glutathionperoxidase-Aktivität	42
4.2.2	Bestimmung der reaktiven Stickstoff (N)-Spezies im Hirngewebe	42
4.3	Expression des Amyloidvorläuferproteins (APP)	43
5	Diskussion	45
5.1	Zentrale cholinerge Transmission bei P2Y ₁ -R-defizienten Mäusen	45

5.1.1	AChE	45
5.1.2	ChAT	46
5.1.3	Acetylcholinrezeptoren in P2Y ₁ -R-defizienten Mäusen	47
5.2	GABA-Rezeptoren bei P2Y ₁ -R-defizienten Mäusen	48
5.3	NMDA-Rezeptoren in P2Y ₁ -R-defizienten Mäusen	49
5.4	Oxidativer Stress in P2Y ₁ -R-defizienten Mäusen	50
5.5	APP-Expression in P2Y ₁ -R-defizienten Mäusen	52
5.6	Ausblick	52
6	Zusammenfassung	54

Bibliographische Beschreibung

Vogt, Laura Anna

Charakterisierung der P2Y₁-Rezeptor-defizienten Maus
Untersuchungen der cholinergen, GABAergen und glutamatergen Neurotransmission

Universität Leipzig, Dissertation

69 Seiten, 150 Literaturangaben, 14 Abbildungen, 3 Tabellen

Referat:

In vorliegender Arbeit sollte untersucht werden, in wieweit die Abwesenheit von P2Y₁-Rezeptoren die cholinerge, GABAerge und glutamaterge Transmission beeinflusst. Hierfür wurden P2Y₁-Rezeptor-defiziente Mäuse im Alter von 3-4 Monaten einem Screening nach repräsentativen Markern der genannten Transmissionssysteme unterzogen. So konnten in Hirnen P2Y₁-Rezeptor-defizienter Mäuse reduzierte Aktivitäten der Acetylcholinesterase im Nc. arcuatus und Substantia nigra sowie Veränderungen in den Bindungsspiegeln der M1-muskarinischen Acetylcholinrezeptoren im ventromedialen Hypothalamus beobachtet werden, während die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren kaum beeinflusst waren. Weiter wurden im cingulären Kortex, Nc. accumbens, Hippocampus, ventromedialer und lateraler Hypothalamus sowie im auditorischen und visuellen Kortex von P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäusen erhöhte GABA_A-Rezeptorbindungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gemessen, während kein Einfluss der P2Y₁-Rezeptor-Defizienz auf NMDA-Rezeptoren gefunden wurde. In P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäusen konnten keine Anzeichen von oxidativem Stress oder veränderter Expression des Amyloidvorläuferproteins beobachtet werden.

Die Erhöhung der GABA_A-Rezeptorbindung in den mesolimbischen Hirnregionen der P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäuse steht im Einklang mit Verhaltensbefunden, die zeigen, dass diese Rezeptoren bei der Vermittlung appetitiver und aversiver Reaktionen eine wichtige Rolle spielen.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ACh-R	Acetylcholinrezeptor
AD	Alzheimer's disease, Alzheimer-Krankheit
ADP	Adenosin 5'-diphosphat
APP	Amyloid Precursor Protein, Amyloidvorläuferprotein
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cAMP	3',5'-Cycloadenosinmonophosphat
ChAT	Cholinacetyltransferase
ERK	extracellular-signal regulated Kinase B
GABA	γ -Aminobuttersäure
GPx	Glutathionperoxidase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KO	Knockout
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
2-MeSATP	2-Methylthio-adenosintriphosphat
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
Nc.	Nucleus
NGF	Nerve Growth Factor ; Nervenwachstumsfaktor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Nitrit
NOS	NO-Synthase

NOx	Stickstoffmonoxidmetabolite
PB	Phosphatpuffer
PLC	Phospholipase C
PNS	peripheres Nervensystem
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
ROD	relative optische Dichte
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TB	Trispuffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-2-aminomethansulfonsäure
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Der P2Y- Rezeptor

1.1.1 Klassifikation

Eine Vielzahl von Studien belegt die Bedeutung von extrazellulärem ATP als Signalmolekül. ATP und andere Nukleotide sind gemeinsam mit „klassischen“ Neurotransmittern in verschiedensten peripheren und zentralen Synapsen gespeichert, aus denen sie durch präsynaptische Depolarisation freigesetzt werden können. ATP aktiviert über spezifische Rezeptoren die purinerge Signalkaskade. Die purinerge Neurotransmission gehört zu den phylogenetisch ältesten Signalsystemen. Im Gehirn spielt die purinerge Signalvermittlung eine besondere Rolle bei der Integration neuronaler und gliärer zellulärer Schaltkreise, da nahezu alle im Hirn vorkommenden Zellen Rezeptoren für Purine und Pyrimidine besitzen (Verkhratsky et al. 2009). In Abb. 1 sind schematisch eine „purinerge“ Synapse und die an der purinergen Neurotransmission beteiligten Prozesse dargestellt.

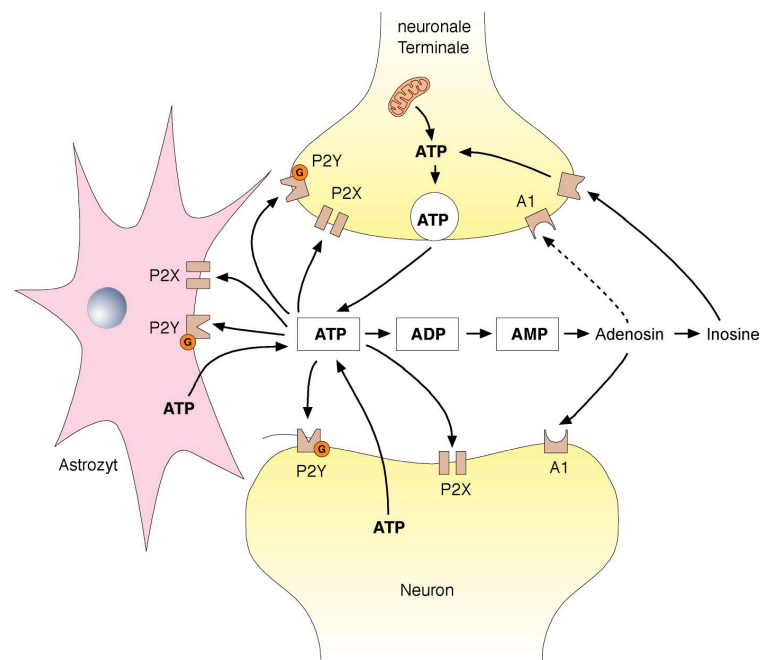


Abb. 1: Schematische Darstellung einer „purinergen“ Synapse und der, an der purinergen Neurotransmission, beteiligten Prozesse.

Das, aus Adenosin über oxidative Phosphorylierung gebildete, ATP wird als Folge einer präsynaptischen Depolarisation in den synaptischen Spalt freigesetzt, wo es sowohl an "schnelle" ionotrope P2X- und "langsame" metabotrope P2Y-Rezeptoren bindet, die sowohl am postsynaptischen Neuron, an Astrozyten als auch an der Präsynapse lokalisiert sind. Die

Rezeptorbindung löst intrazelluläre Signalkaskaden im postsynaptischen Neuron bzw. Astrozyten aus. Die präsynaptischen Rezeptoren können ihrerseits die ATP-Freisetzung modulieren. Das freigesetzte ATP wird durch Ektonukleotidasen stufenweise zu ADP, AMP und Adenosin dephosphoryliert und kann weiter durch Desaminierung zu Inosin umgesetzt werden. Adenosin selbst besitzt spezifische Rezeptoren (P1-Rezeptoren: A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃), die prä- und postsynaptisch lokalisiert sind und hier die ATP-Wirkungen modulieren können. Inosin wird in die Präsynapse über spezifische Transportproteine reinternalisiert, wo es für die ATP-Synthese zur Verfügung steht. (Modifiziert nach Burnstock 2008).

Durch die Bindung an Nukleotid-Rezeptoren werden schnelle Antworten über Änderungen des Membranpotentials (ligandgesteuerte Ionenkanäle) vermittelt oder langsame Antworten über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) realisiert.

Im Gegensatz zu den ATP-abhängigen ligandgesteuerten Ionenkanälen, P2X-R, die eine schnelle exzitatorische Transmission in erregbaren Geweben vermitteln, werden die metabotropen GPCRs als P2Y-R bezeichnet (Burnstock 2004, 2006). Die P2Y-R vermitteln die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) oder modulieren die Adenylatcyclase über die G α -Untereinheiten und $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen, wodurch die Bildung von Botenstoffen angeregt wird, was letztlich zur Beeinflussung der Genexpression oder Phosphorylierung von spannungsabhängigen Ionenkanälen führt (Abbracchio et al. 2009).

Zur Zeit sind acht, pharmakologisch charakterisierte, Subtypen des P2Y-R bekannt: die Adeninnukleotid-selektiven P2Y₁-, P2Y₁₁-, P2Y₁₂- und P2Y₁₃-R-Subtypen sowie die Uracil präferierenden P2Y₄- und P2Y₆-R-Subtypen. Der P2Y₂- und der Nager-P2Y₄-R-Subtyp sind sensitiv für ATP und UTP. Der P2Y₁₄-R erkennt ausschließlich zuckerkonjugierte Nukleotide (Burnstock 2004; Abbracchio et al. 2003; Sak et al. 2002; Fischer und Krügel 2007). Abzugrenzen sind die P1-R, die durch Adenosin aktiviert werden (A₁-, A_{2A}-, A_{2B}-, A₃-R) und ebenfalls zur Familie der GPCRs gehören.

Funktionelle P2Y-R sind schon sehr früh in der evolutionären Entwicklung zu finden, z.B. im kleinen Rochen *Raja erinacea*. Ein primitiver P2Y-ähnlicher Rezeptor ist in wirbellosen Tieren, wie der blauen Krabbe *Callinectes sapidus*, lokalisiert. Daraus kann man schließen, dass die Nukleotid-Rezeptoren zu den ältesten auf der extrazellulären Membranseite lokalisierten Rezeptoren gehören, die im Tierreich exprimiert werden (Dranoff et al. 2000).

1.1.2 Struktur von P2Y-Rezeptoren und ihre Verteilung im Hirn

Strukturell zeigen die P2Y-R, die für GPCR typische Membrantopologie, sieben hydrophobe transmembranale Domänen, die über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Loops

verbunden sind (siehe Fig. 2; Barnard et al. 1994). Der NH₂-Terminus liegt extrazellulär, der COOH-Terminus im Zytoplasma. Letztgenannter besitzt übereinstimmende Bindungsstellen für Proteinkinasen. Es wird von drei verschiedenen Teilstrukturen ausgegangen, die verantwortlich für die Bindung von Agonisten, wie ADP, sind. Der strukturelle Unterschied der intrazellulären Loops und des COOH-Terminus unter den P2Y-R-Subtypen bestimmt die Kopplung mit verschiedenen G-Proteinen. Mehrere PKC- und G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase-Phosphorylierungsstellen sind auf dem dritten intrazellulären Loops und dem COOH-Terminus vorhanden (Brinson und Harden 2001; Flores et al. 2005). Die zwei Arginin-Reste (R333/R334) im COOH-Terminus des menschlichen P2Y₁-R scheinen essentiell für die G α_q -Kopplung zu sein (Ding et al. 2005). Abb. 2 veranschaulicht schematisch die Membrantopologie des P2Y-R.

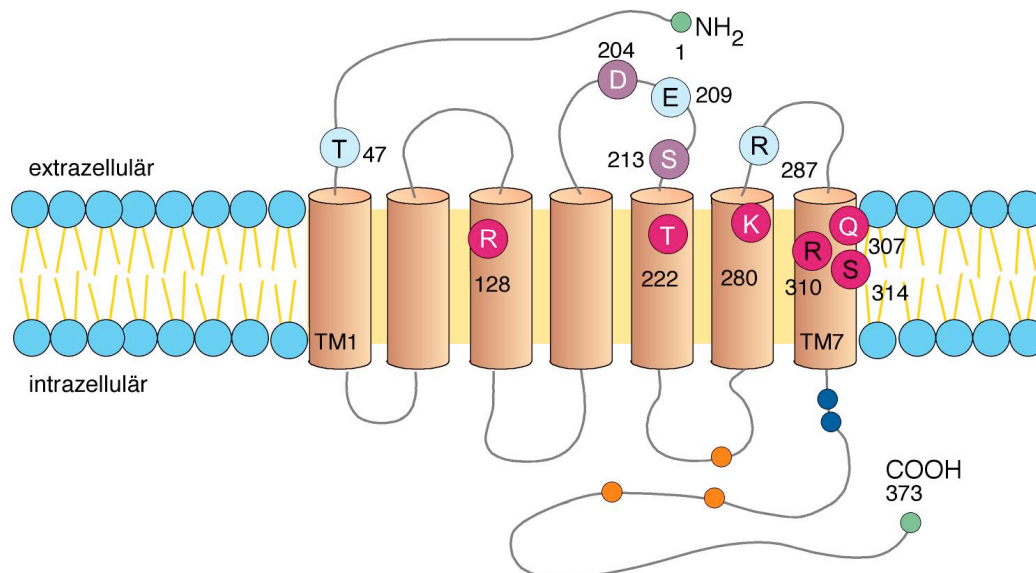


Abb. 2: Schematische Darstellung der Membrantopologie des P2Y-R. Die P2Y-R bestehen aus sieben transmembranären Domänen (TM1-TM7), verbunden durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Loops. Zwischen den extrazellulären Loops und den äußersten Segmenten der transmembranären Domänen sind die hypothetischen Bindungsstellen für die Rezeptoragonisten am menschlichen P2Y₁-R dargestellt. Es wird von drei verschiedenen Strukturen ausgegangen, die für die Bindung von ADP verantwortlich sind (blaue Kreise: Meta-Bindungsstelle I, weiße Buchstaben: Meta-Bindungsstelle II, rote Kreise: Hauptbindungsstelle). Die strukturelle Verschiedenheit der Rezeptorkinase-Phosphorylierungsstellen ist auf dem dritten intrazellulären Loop und dem COOH-Terminus (orange Kreise) angezeigt. Die zwei Arginin-Reste (R333/R334; dunkel-blaue Kreise) im COOH-Terminus des menschlichen P2Y₁-R scheinen essentiell für die G α_q Kopplung zu sein.

Basierend auf der für die Selektivität der G-Protein-Kopplung und nachfolgende Signaltransduktion determinierenden Aminosäure-Sequenz werden zwei verschiedene P2Y-R-Untergruppen unterschieden.

Die P2Y_{1, 2, 4, 6, 11}-R-Untergruppe ist hauptsächlich an Gα_{q/11}-Protein gekoppelt, das die Phospholipase C-β (PLC-β) und damit die Bildung von Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) stimuliert. Nachfolgend wird Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern mobilisiert (Volonte et al. 2006). Die Rezeptoren der P2Y_{12, 13, 14}-Untergruppe koppeln hauptsächlich an G-Proteine mit Gα_{i/o}-Untereinheiten, die die Aktivität der Adenylatcyclase und die cAMP-Formation modulieren. Die Aktivierung von P2Y_{1, 2} und 4-R kann die Freisetzung von Glutamat aus hippocampalen Neuronen inhibieren (Rodrigues et al. 2005). ATP und andere Nukleotide, die an P2Y-R wirken, können prä- und postsynaptische Effekte sowohl im Zentralnervensystem (ZNS) als auch im peripheren Nervensystem (PNS) auslösen. Im Kortex und Hippocampus inhibieren Nukleotide die Freisetzung von ACh und Noradrenalin (NE) via Wirkung an der Präsynapse. Die Freisetzung von Dopamin, Serotonin und Glutamat betreffend, werden sowohl inhibitorische als auch verstärkende präsynaptische Effekte für Nukleotide in verschiedenen Gehirnregionen beschrieben (Cunha und Ribeiro 2000).

Die pharmakologische Charakterisierung und Unterscheidung von P2Y-R ist aus mehreren Gründen mit Problemen behaftet.

Erstens, bis jetzt sind nur wenige selektive subtypenspezifische und ausreichend potente Liganden verfügbar. Zweitens, trotz ihrer chemischen Stabilität, ist die Kontamination der kommerziell verfügbaren Liganden mit Nukleotiden oder Nukleosiden nicht auszuschließen. Drittens, Ektonukleotidasen, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind sowie lösliche Nukleotidasen, hydrolysieren extrazelluläre Nukleotide sehr schnell. Und letztlich wird die Untersuchung zentraler purinerger Mechanismen am Gesamtorganismus erschwert, da derzeit keine selektiven und ausreichend lipophilen Liganden verfügbar sind, die die Blut-Hirn-Schranke in notwendigem Ausmaß passieren können. Ein wertvolles und ergänzendes Werkzeug zur Untersuchung der Bedeutung purinerger Signalweiterleitung im ZNS sind deswegen die, nunmehr für verschiedene P2Y-R Subtypen generierten, Knockout-Mäuse.

ATP-gesteuerte P2X-R und metabotrope P2Y-R sind in vielen Geweben einschließlich des Hirns beschrieben worden (Burnstock und Knight 2004). Ebenso wurde für viele P2Y-R-Subtypen (P2Y_{1, 2, 4, 6, 13}) die mRNA in diesen Geweben und dem ZNS identifiziert.

Die mRNA des P2Y₁-R, als Grundvoraussetzung für die Expression des korrespondierenden Rezeptor-Proteins, ist beim Menschen in der Plazenta, der Prostata, im Gehirn, im Herz und in der Skelettmuskulatur, aber auch im Darm, in immunologischen Zellen, im Gefäßendothel und in den Blutplättchen nachgewiesen worden (Moore et al. 2001).

Im Gehirn von Säugetieren konnte die Expression des korrespondierenden P2Y₁-R-Protein im zerebralen Kortex, Hippocampus, Nc. caudatus, Putamen, Globus pallidus, Nc. habenularis, Nc. subthalamicus, im Mittelhirn und im Kleinhirn, anhand von autoradiographischen und immunhistochemischen Studien demonstriert werden (Simon et al. 1997, Moore et al. 2000, Moran-Jimenez und Matute 2000).

Rodrigues et al. (2005) wiesen mittels Einzel-Zell-RT-PCR die mRNA des P2Y₁-R in hippocampalen Pyramidenzellen der Ratte nach. Neben der Assoziation mit neuronalen Strukturen im ZNS des Menschen und der Ratte (Moore et al. 2000), sind die P2Y₁-R ebenso auf Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen von Säugern zu finden (Simon et al. 1997; Fumagalli et al. 2003; Bianco et al. 2005; Franke et al. 2004).

P2Y₁-R werden ebenfalls in neuronalen Progenitorzellen der Ratte (Mishra et al. 2006) und in verschiedenen sensorischen Neuronen exprimiert, was auf eine Rolle in der Gehirnentwicklung und -reparatur sowie auf die Beteiligung an sensorischer Rezeption hinweist (Sanada et al. 2002; Ruan und Burnstock 2003; Kobayashi et al. 2006; Gerevich et al. 2005; Ruan und Burnstock 2003; Zimmermann 2006a).

1.1.3 Funktionen des P2Y₁-Rezeptor im ZNS

In vivo Untersuchungen an P2Y₁-R zeigten, dass das mesolimbische-mesokortikale System relevant für die Erzeugung und Expression von belohnungsbezogenem Verhalten ist (Krügel et al. 2001a, 2001b). Ein endogener ADP/ATP-artiger Tonus wirkt verstärkend auf die Freisetzung von Dopamin aus Axonendigungen im Nc. accumbens und aus der somatodendritischen Region dieser Neurone im ventralen Tegmentum, ebenso auf die Freisetzung von Glutamat, wahrscheinlich über Stimulation von P2Y₁-R (Krügel et al. 2004). Die Ubiquität der purinergen Signalwirkung prädestiniert Nukleotide zur Beteiligung an verschiedenen funktionellen Mechanismen in der Entwicklung, der plastischen Wiederherstellung und der Regeneration des Nervensystems (Zimmermann 2006b und Dale 2008).

Die Aktivierung von metabotropen P2Y₁-R und P2Y₂-R in kultivierten adulten neuronalen Stammzellen steigert die Zellproliferation in der Gegenwart von mitogenen

Wachstumsfaktoren. Diese folgen Nukleotid- und NGF-Rezeptor-vermittelten Synergismen in der Progenitorzell-Proliferation (Mishra et al. 2006, Lin et al. 2007).

Es wird angenommen, dass P2Y-R die synaptische Genexpression in Neuron-Neuron-Synapsen beeinflussen. So wurde gezeigt, dass die Aktivierung des P2Y₁-R die AChE-Promotoraktivität in kultivierten kortikalen Neuronen reguliert. (Siow et al. 2005). In Schnitten des präfrontalen Kortex der Ratte hemmen die P2Y₁-R die Induktion der Langzeit-Depression (LTD). Ein Prozess, der in engem Zusammenhang mit Lernvorgängen zu stehen scheint (Guzman et al. 2010). Aus Analysen über die Rolle von ATP als Transmitter im Hippocampus und seiner Rolle in der synaptischen Plastizität schloss Wieraszko (1996), dass das purinerge System speziell in der Langzeit-Erhaltung, mehr als in der anfänglich vermuteten Induktion von LTP („long-term potentiation, Langzeit-Potenzierung), involviert ist.

1.1.3.1 P2Y₁-R vermittelte Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen

In den letzten Jahren konnten Nukleotide als potente extrazelluläre Signalmoleküle identifiziert werden, die in verschiedene Funktionen von Astrozyten involviert sind, wie die gliale-neuronale Kommunikation. Es wurde gezeigt, dass ATP von Astrozyten freigesetzt, die Ca²⁺ Signalvermittlung innerhalb und zwischen Astrozyten induziert (van den Pol et al. 1992; Guthrie et al. 1999; Cotrina et al. 2000). Diese Tatsache und der Nachweis von P2Y₁-R auf Astrozyten bestärken die Vermutung, dass freigesetztes ATP Astrozyten via P2Y₁-R aktiviert, die ihrerseits einen Anstieg an intrazellulärem Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) und später die Ausbreitung von Ca²⁺-Wellen zwischen benachbarten Astrozyten bewirken, die möglicherweise zur Synchronisierung ihrer Aktivität führen (Verkhratsky und Toescu 2006, Burnstock 2007).

Dies stützt die Ansicht, dass Gliazellen, insbesondere Astrozyten, durch die purinerge Signalvermittlung in das neuronale-gliäre Kommunikationsnetzwerk integriert sind (Fellin et al. 2006; Inoue et al. 2007).

1.1.3.2 P2Y₁-R vermittelte trophische Funktionen

Proliferation

Nukleotide im ZNS tragen zu Zellwachstum, -differenzierung, -proliferation oder Zelltod bei. Diese Effekte werden durch Nukleotidbindung an P2Y₁-R und der Aktivierung einer Reihe nachgeschalteter intrazellulärer Signalkaskaden erreicht. Neben der Phospholipase A₂ (Bolego et al. 1997, Brambilla et al. 2002) und der Phospholipase D sind die MAPK-Signalwege (ERK1/2, JNK, p38, ERK5) und die Aktivierung von Akt (PKB) involviert (von Kügelgen et

al. 2000; Brambilla et al. 2002; Volonte et al. 2003, Franke et al. 2009; Widman et al. 1999, Kyriakis et al. 1996). Am Ende der verschiedenen Kinase-Kaskaden steht die Bildung von Transkriptionsfaktoren, um die Transkription von Genen zu veranlassen, die entscheidend für die zelluläre Proliferation/ Differenzierung oder aber apoptotischen Zelltod sind. Im Gehirn üben Nukleotide zusammen mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen, z.B. Chemokinen, einen synergistischen Effekt auf die Zellproliferation aus, durch parallele Aktivierung des MAPK Signalwegs und durch Transaktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Lenz et al. 2000, Neary und Zhu 1994, Neary et al. 1994).

Neurogenese

Verschiedene Zelltypen, darunter kapilläre endotheliale Zellen des menschlichen Gehirns, meningeale Fibroblasten und menschliche Astrozytoma-Zelllinien sowie neuronale Progenitorzellen können durch Nukleotide zur Proliferation stimuliert werden (Rathbone et al. 1992). Neurosphären der subependymalen Schicht von erwachsenen Mäusen exprimieren P2Y₁-R und P2Y₂-R, die auf ATP, ADP bzw. UTP antworten (Mishra et al. 2006). Der P2Y₁-R Antagonist MRS2179 schwächt die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Proliferation von Neurosphären ab. Dies deutet auf eine kontinuierliche Freisetzung von Nukleotiden aus diesen Zellen hin und lässt vermuten, dass der synergistische Effekt der P2Y₁-R-Aktivierung auf die Wachstumsfaktor vermittelte Zellproliferation essentiell für die Kontrolle der Neurogenese bei Erwachsenen ist. Eine Untersuchung an der NT2 Zelllinie (Zelllinie aus einem humanen Teratomkarzinom) zeigte eine durch P2Y₁-selektive Nukleotide hervorgerufene vorübergehende Ca²⁺ Erhöhung, so dass der P2Y₁-R ebenso an der embryonalen Neurogenese teilzunehmen scheint (Moore et al. 2002).

Zelldifferenzierung

In embryonalen Gehirngeweben der Ratte wurde die mRNA von verschiedenen P2Y-R (P2Y₁, 4, 6, 12), abhängig vom Status der Ontogenese, nachgewiesen (Franke et al. 2006; Bennett et al. 2003; Sasaki et al. 2003; Cheung et al. 2003). Diese Rezeptoren induzieren und verstärken die Zelldifferenzierung, wie anhand der Neuritogenese in kultivierten neuronalen Zellen gezeigt wurde (D'Ambrosi et al. 2001).

ADP-sensitive P2Y₁-R werden ebenso in oligodendrozytären Progenitorzellen exprimiert, deren Migration und Differenzierung sie stimulieren. Die Aktivierung von P2Y₁-R inhibiert außerdem die mitogene Antwort auf die Stimulation mit dem platelet-derived growth factor

(PDGF) (Agresti et al. 2005). Diese Erkenntnisse heben die bedeutende regulierende Rolle dieses Subtyps in der Signalwirkung und in der Entwicklung von Oligodendrozyten hervor.

1.2 Der P2Y₁-Rezeptor und cholinerge Neurotransmission

Im ZNS finden sich cholinerge Neurone in Form von Projektionsneuronen und Interneuronen. Projektionsneurone sind hauptsächlich im Vorderhirn und oberen Hirnstamm lokalisiert, Interneurone finden sich im Corpus striatum, Nc. accumbens, Hippocampus, Kortex, Hypothalamus und in der Medulla spinalis. Ferner bestehen cholinerge Projektionsneurone auch aus Motoneuronen in der Medulla spinalis (Hirnnerven 3-7 und 9-12) sowie aus cholinergen Neuronen im sympathischen und parasympathischen Nervensystem (siehe z.B. Martinez-Murillo und Rodrigo 1995).

Die cholinergen Neurone im basalen Vorderhirn und in der Formatio reticularis des Pons sind Teil des aufsteigenden retikulären Aktivierungssystems. Die Efferenzen der cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirnkomplexes (mediales Septum, horizontaler und vertikaler Ast des Diagonalbandes nach Broca und Nc. basalis Meynert), machen den größten Teil der cholinergen Projektionen in den Kortex und in den Hippocampus aus, während das pontine cholinerge System hauptsächlich über den Nc. intralaminare thalami wirkt und nur für einen kleinen Teil der Innervation des Kortex sorgt.

Insbesondere Projektionsneurone, lokalisiert im medialen Septum, innervieren den Hippocampus, während solche im vertikalen und horizontalen Diagonalband in den anterioren cingulären Kortex und Bulbus olfactorius projizieren. Aus dem Nc. basalis Meynert erhalten der Kortex und die Amygdala den Hauptteil der cholinergen Innervation (Bigl et al. 1990). Sie stellen ein Kontinuum aus großen Zellen dar.

Neben den cholinergen Zellen befinden sich im basalen Vorderhirnkomplex auch GABAerge und peptiderge Neurone (Mufson et al. 2002). GABAerge Neurone innerhalb des Systems im basalen Vorderhirn agieren als Interneurone, die Verbindungen mit cholinergen Neuronen herstellen (Frotscher 1992) oder als Projektionsneurone, die in den Hippocampus projizieren (Toth et al. 1993).

Physiologisch spielt das cholinerge System eine Rolle bei der Kontrolle des cerebralen Blutflusses (Biesold et al. 1989; Barbelivien et al. 1999; Sato et al. 2004), in der kortikalen Aktivität (Detari et al. 1999; Lucas-Meunier et al. 2003) und in der Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus (Lee et al. 2005) sowie bei der Realisierung kognitiver Funktionen und kortikaler Plastizität (Arendt und Bigl 1986; Bigl und Schliebs 1998; Schliebs und Bigl 1996; Schliebs et al. 1996, Review siehe z.B. McKinney 2005).

Befunde über die Bedeutung der P2Y₁-R im Zusammenhang mit dem cholinergen System existieren wenige. Ward und Fletcher (2009) zeigten, dass der P2Y₁-R von cholinergen amakrinen Zellen der Retina exprimiert wird. Bei Mäusen konnten P2Y₁-R mRNA Transkripte sowohl in cholinergen Neuronen myenterischer als auch submukosaler Ganglien des Ileums nachgewiesen werden (Giaroni et al. 2002).

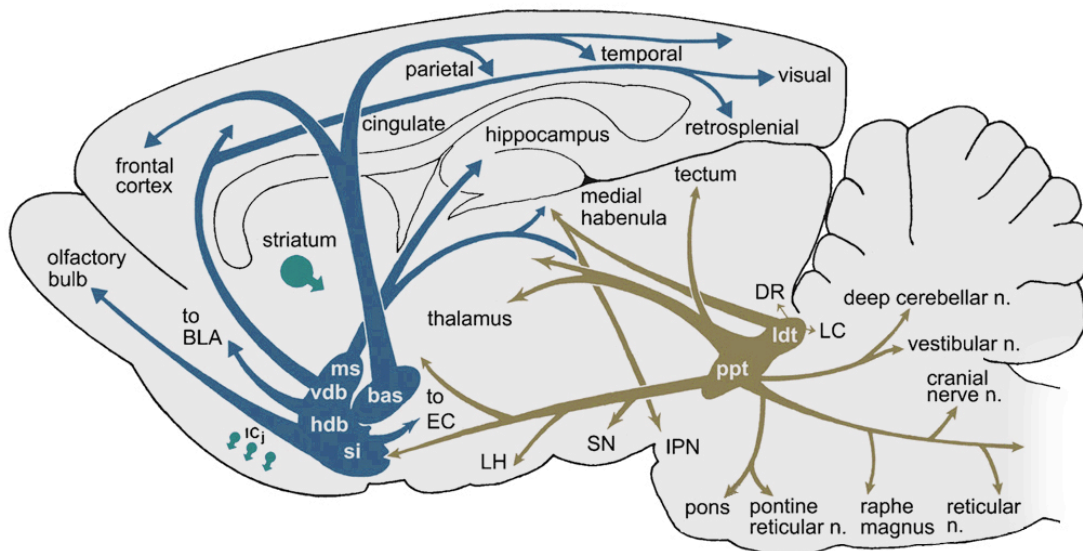


Abb. 3: Schematische Darstellung cholinergischer Neurone und ihrer Nervenfaserbündel im ZNS. Abk.: bas, Nc. basalis; BLA, Amygdala (Nc. basalis, Nc. lateralis); DR, dorsale Raphe; EC, entorhinaler Kortex; hdb, horizontaler Teil des Brocabandes; Icj, Nc. interstitialis Cjal; IPN, Nc. interpeduncularis; LC, Locus caeruleus, ldt, Nc. laterodorsalis tegmenti; LH, lateraler Hypothalamus; ms, mediales Septum; ppt, Nc. pedunculopontinus tegmenti; si, Substantia innominata; SN, Substantia nigra; vdb, vertikaler Teil des Brocabandes. Modifiziert nach Butcher und Woolf (2004) und Woolf (1991).

1.3 Die P2Y₁-R-defiziente Maus als Modell zum Studium von Rolle und Funktion von P2Y₁-Rezeptoren in vivo

Anhand von Studien an genmodifizierten Mäusen können signifikante Einblicke in die qualitative und quantitative Relevanz für die physiologische und pathophysiologische Bedeutung eines gegebenen Genprodukts gewonnen werden und potentielle Kompensationsmechanismen identifiziert werden.

Es wurden Knockout (KO)-Mäuse für verschiedene P2-R generiert, die neue Hinweise bezüglich ihrer Beteiligung an verschiedenen Organfunktionen lieferten. So wurde mit Hilfe von KO-Mäusen entdeckt, dass die Aktivität von P2X₂-R und P2X₃-R entscheidend für die Kommunikation von Geschmacksknospen mit gustatorischen Nerven ist (Finger et al. 2005),

dass die P2X7-R proinflammatorisch wirken und die nozizeptive Sensitivität verstärken (Chessell et al. 2005; Labasi et al. 2002) oder dass die P2Y₂-R in neuronales Wachstum (Arthur et al. 2005) und in neutrophile Chemotaxis (Chen et al. 2006) involviert sind.

Neue Erkenntnisse an genmodifizierten Mäusen wurden im Zusammenhang mit der Rolle des P2Y₂-R in der nicht-renalen K⁺-Sekretion im Kolon (Matos et al. 2005), dem Ca²⁺-Signalling in den Fibroblasten der Lunge und den epithelialen Zellen der Atemwege (Homolya et al. 1999) sowie der Cl⁻-Sekretion in der Trachea und Gallenblase (Cressman et al. 1999), gewonnen. Die P2Y₄-R indessen sind in Verbindung mit der Cl⁻-Sekretion im Jejunum und Kolon gebracht worden (Ghanem et al. 2005 und Robaye et al. 2003), ebenso die K⁺-Sekretion im Kolon (Matos et al. 2005).

Inscho et al. (2003) zeigten, dass P2X1-KO-Mäuse eine beeinträchtigte renale Autoregulation haben. Goncalves et al. (2006) legten den ersten Beweis vor, dass P2X7-R an der Infiltration von renalen Makrophagen, Kollagen-Ablagerungen und Apoptose beteiligt sind, als Antwort auf uretrale Obstruktion in Mäusen.

Nach Gachet (2008) spielen ADP und ATP eine bedeutende Rolle in der Plättchen-Aktivität. Deren Rezeptoren sind potentielle Ziele für antithrombotische Medikamente. Der ATP-gesteuerte Kationen-Kanal P2X1 und die zwei G-Protein-gekoppelten P2Y₁-R und P2Y₁₂-R tragen selektiv zur Plättchen-Aggregation und Formation eines Thrombus bei. Entsprechend seiner zentralen Rolle in Wachstum und Stabilität eines Thrombus hat sich der P2Y₁₂-R als Ziel von antithrombotischen Medikamenten, wie die Thienopyridine Clopidogrel und Prasugrel, etabliert oder für Substanzen, die sich in klinischer Prüfung befinden, wie die kompetitiven Antagonisten, Cangrelor oder AZD6140. Die optimale Inhibition dieses Rezeptors für eine klinische Effizienz sowie der Schutz der Patienten vor unakzeptablen Blutungen sind derzeit Gegenstand der Debatte.

Studien an P2Y₁-R- und P2X1-R-KO-Mäusen sowie die Nutzung von selektiven P2Y₁-R und P2X1-R Antagonisten haben gezeigt, dass diese Rezeptoren ebenfalls attraktive Targets für neue antithrombotische Präparate sein könnten.

Im Zusammenhang mit Atherosklerose zeigten Hechler et al. (2008), anhand von Apolipoprotein E-defizienten (ApoE^{-/-}) und P2Y₁^{-/-}/ApoE^{-/-}-Mäusen, dass im Alter von 17 Wochen Läsionen im Sinus aorticus und der gesamten Aorta in P2Y₁^{-/-}/ApoE^{-/-}-Mäusen kleiner als in den ApoE^{-/-}-Tieren waren.

Leon et al. (2005) untersuchten die Rolle des P2Y₁-R in der Glukose-Homeostase sowie die Insulin-Sekretion in Mäusen. Die Studie zeigte, dass in satten P2Y₁-R-defizienten Tieren öfter Glykämien und Insulinämien, verglichen mit den Wildtyp-Mäusen, vorkamen, obgleich kein

Unterschied nach nächtlicher Futterdeprivation zu finden war. Dies lässt auf einen Zusammenhang von P2Y₁-R und Kontrolle des Glukose-Metabolismus schließen.

2 Problemstellung

Einerseits spielt der P2Y₁-R eine bedeutende Rolle in der zentralnervalen Kommunikation und ist bei zahlreichen trophischen Mechanismen, wie Entzündungsprozessen, De- und Regenerationsmechanismen beteiligt für die bisher nur limitierte Informationen aus *in vivo* bzw. *ex vivo* Studien vorliegen. Andererseits sind die cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns und des Striatums besonders vulnerabel gegenüber oxidativem/nitrosativem Stress und unterliegen in einer Vielzahl von zerebralen Erkrankungen, wie in der Alzheimerschen Erkrankung, der Parkinsonschen Krankheit, dem Down-Syndrom, aber auch bei chronischem Alkohol-Missbrauch einer markanten Degeneration (Arendt et al., 1983). Ob die zerebralen P2Y₁-R und die cholinerge Transmission in einem physiologisch relevanten Zusammenhang stehen, ist bisher nahezu ungeklärt.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Beeinflusst das Defizit an P2Y₁-R in den Knockout-Mäusen die Expression/Aktivität des cholinergen Systems (AChE-Aktivität, Cholinacetyltransferase [ChAT]-Aktivität)?

Der Nachweis der AChE-Aktivität soll durch die histochemische Methode nach Andrä und Lojda (1986) sowie durch die radiochemische Methode nach Johnson und Russel (1975) erfolgen. Der Nachweis für die ChAT-Aktivität erfolgt durch die radiochemische Methode nach Fonnum (1975).

- Stehen andere Transmittersysteme (exzitatorisch: Glutamat; inhibitorisch: GABA) in Zusammenhang mit der Expression des P2Y₁-R? Durch quantitative Rezeptorautoradiographie für nACh-, GABA_A-, NDMA- und M₁-mACh Rezeptoren soll dies geklärt werden.
- Sind Marker für oxidativen Stress in der P2Y₁-R-Knockout-Maus verändert? Dies soll durch Bestimmung der reaktiven N-Spezies (NO, Nitrit) sowie der Enzymaktivität der Glutathionperoxidase erreicht werden?
- Gibt es Unterschiede in der Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins (APP)?

Diese Fragen sollen durch die Untersuchung von Hirnen von P2Y₁-R-defizienten Mäusen und ihrer Wildtypen beantwortet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei den Firmen MERCK (Darmstadt), SIGMA (Deisenhofen), SERVA (Heidelberg) und CARL ROTH (Karlsruhe) erworben. Es wurde die höchstmögliche Reinheit und Qualität gewählt.

3.1.1 Radiochemikalien

Für die Autoradiographie und radiochemische Enzymanalytik wurden nachstehend genannte radioaktiv markierte Verbindungen verwendet, die alle von der Firma Perkin Elmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim bezogen wurden.

- [n-Methyl- ^3H]-Pirenzepin; spezifische Aktivität: 3182,0 GBq/mmol
- [5,-6-Bicyl ^3H]-Epibatidin; spezifische Aktivität: 9,250 MBq/mmol
- [Methylamin- ^3H]-Muscimol; spezifische Aktivität: 185,0 GBq/mmol
- (+)-[3- ^3H]-MK-801 (NEN-DuPont): spezifische Aktivität: 814,0 GBq/mmol
- [Acetyl- ^3H]-Acetylcholinjodid; spezifische Aktivität: 2,8 GBq /mmol
- [^3H]-Acetyl-CoA; spezifische Aktivität

3.1.2 Verwendete Antikörper

- monoklonales anti-APP, Klon 22C11 der Firma CHEMICON (North Carolina)
- monoklonales Maus-anti- β -Aktin, der Firma SIGMA
- Ziege-anti-Maus-Peroxidase gekoppelt, der Firma BOEHRINGER, Mannheim

3.2 Geräte

- Gefriermikrotom: Leica, Modell SM 200 R
- Mikrom HM 500 OM (Autoradiographie)
- Liquid Scintillation Counter PW 4700 der Firma Philips
- Photometer: Hitachi U-2000 Spectrophotometer
- Elektrophorese- und Blotkammer: Bio Rad

3.3 Versuchstiere

Besonderer Dank gilt Dr. C. Gachet (INSERM, Strassburg, Frankreich) für die Bereitstellung der Zuchtpaare der C57Bl/6N-P2Y₁-R^{-/-} Mäuse (P2Y₁-R-Knockout). Die Züchtung der P2Y₁-R-Knockout-Mäuse und der entsprechenden Wildtypen erfolgte im Medizinischen Experimentellen Zentrum (MEZ) der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Sie wurden nach dem Absetzen von der Mutter in den Tierstall des Rudolf-Boehm-Institutes

übernommen und unter Standardbedingungen mit zwölf Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten.

Alle Untersuchungen erfolgten an naiven männlichen Mäusen (12 bis 16 Wochen alt; durchschnittliches Gewicht 25 ± 7 g).

Herstellung der P2Y₁-R-KO-Mäuse (C57BL/6N)

Die ersten 6000 bp des P2Y₁-R-Gens, die die gesamte codierende Sequenz enthalten, wurden geklont und anschließend durch Insertion einer PGK-neo-poly(A)-Cassette (Phosphoglyceratkinase-Neomycin-poly(A)-Cassette, Neomycin-Resistenz-Gen, Neo-Cassette) an Stelle 3208 unterbrochen (Leon et al. 1999). Der so entstandene Vektor wurde linearisiert und durch Elektroporation in P1 embryonale Stammzellen (ES) der Mauslinie 129Sv eingeschleust. Die Neomycin-resistenten Klone wurden isoliert. Nach der Gewinnung ihrer DNA und deren Verdauung durch das Restriktionsenzym *Bam*HI erfolgte das Screening der selektierten Zellklone auf eine erfolgreiche homologe Rekombination durch PCR. Mittels Southern Blot wurde die gewünschte homologe Rekombination durch ein außerhalb der inserierten Cassette gelegenes DNA-Fragment des P2Y₁-R-Gens, das sich von Base 6847 bis 8179 erstreckt, dargestellt: Das Wildtyp-Allel umfasst 12000 bp, das rekombinante Allel 9500 bp.

Die behandelten ES wurden in Blastozysten der Mauslinie C57BL/6N injiziert. Die daraus entstandenen männlichen Chimären wurden mit C57BL/6N-Weibchen verpaart. Die heterozygoten Nachkommen (je 50% C57BL/6N und 129Sv) wurden untereinander gekreuzt, um für P2Y₁-R^{+/+} und P2Y₁-R^{-/-} homozygote Tiere zu erhalten, die mit dem C57BL/6N-Hintergrund weiter verkreuzt wurden. Der genetische Drift des hier verwendeten Wildtyps ist nicht erfasst.

Das folgende PCR-Protokoll wurde für die Genotypisierung der P2Y₁-R-Knockout-Mäuse genutzt. Für die PCR wurden 25 µl einer Lösung verwendet, die aus 1 µl lysierter genomischer DNA, 10,5 µl PCR-Wasser sowie 0,25 µl eines jeden Primers und 12,5 µl des DNA Taq Master Mix Kit (QIAGEN, Hilden Germany) bestand. Als Primer wurden eingesetzt:

NM:	5' - ACA GTA CTG TCG CCT CAA CTG CAG CAG TTT - 3'
P2SB-rev:	5' - CCG AAG ATC CAG TCA GTC TTG TTG AAG TAG - 3'
Neo I :	5' - GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAC TTC TTC - 3'
P2SB-rev:	5' - CCG AAG ATC CAG TCA GTC TTG TTG AAG TAG - 3'.

Die PCR und Gel-Trennung der PCR-Produkte wurde nach Standardprotokollen vorgenommen (Drendel 2011).

3.4 Aufarbeitung des Hirngewebes

3.4.1 Präparation

Zur Gewinnung des Hirngewebes wurden die Versuchstiere mittels Kohlenstoffdioxid narkotisiert und anschließend dekaptiert. Die Tötung und Präparation der Tiere erfolgten am Institut für Pharmakologie und Toxikologie in Leipzig von Frau Dr. Krügel (TV Anzeige 1/06). Nach Öffnung des Schädels wurde das Gehirn entnommen und entlang der Mittellinie in die linke und rechte Hälfte separiert. Die linke Hälfte wurde 24 h in 4%-Paraformaldehyd (in 0,1 M PB-Puffer) immersionsfixiert und bis zu ihrer Verwendung für histochemische Analysen in 30%iger Saccharoselösung (in 0,1 M PB-Puffer, pH 7,4, mit 0,05% Natriumazid) äquilibriert und bei 4°C gelagert. Die rechten Hirnhälften wurden auf Trockeneis eingefroren und bis zur Nutzung für biochemische Analysen in Eppendorfbechern bei -20°C aufbewahrt. Des Weiteren wurden Schwanzbiopsien entnommen, um den Genotyp der transgenen Versuchstiere zu bestimmen und zu überprüfen. Dafür wurden die Schwanzspitzen dekaptiert und ebenfalls bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.4.2 Anfertigung von Hirnschnitten

Für histochemische Analysen mussten zunächst Gewebeschnitte des zu untersuchenden Hirnmaterials angefertigt werden. Dafür wurde mit einem Skalpell das Cerebellum von der linken immersionsfixierten Hirnhälfte entfernt. Im Anschluss wurde das verbleibende Hirngewebe dorsal mit Gewebekleber (Tissuetek® O.C.T.; SAKURA) auf dem Objektisch des Gefrierschnitt-Mikrotoms (Leica Modell SM 200 R) fixiert und zunächst auf -40°C eingefroren. Nachdem das Gewebe vollständig durchgefroren war, wurden am Mikrotom bei -25°C Koronarschnitte von 30 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden mit einem Pinsel vom Messer entfernt und bis zur weiteren Verwendung in 0,1 M PB-Puffer, pH 7,4 mit 0,05% Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

Ein Teil der auf Trockeneis eingefrorenen nativen (unfixierten) Hirnhälften wurde für die Herstellung von Kryostatschnitten zur Autoradiografie herangezogen. Hierbei wurden am Mikrotom-Kryostat (Cryo-Star HM 500 OM, MICROM, Walldorf) 16 µm dicke Mikrotom-Kryostat Gefrierschnitte bei -20°C hergestellt und auf beschichtete SuperFrost®Plus-Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

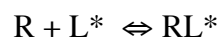
3.4.3 Anfertigung von Hirnhomogenaten

Auf Trockeneis eingefrorene native (unfixierte) Hirnhälften wurden in 0.25 M Saccharoselösung, die einen Proteaseinhibitorcocktail (Complete; Roche) enthielt, mittels Ultraschall für dreimal zehn Sekunden bei drei Hertz, homogenisiert, wobei eine 10% Gewebesuspension hergestellt wurde. Die Homogenate wurden aliquotiert und bis zur Verwendung für biochemische Untersuchungen bei -20°C gelagert.

3.5 Rezeptorautoradiographie

3.5.1 Prinzip der Rezeptorautoradiographie

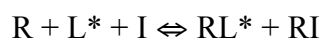
Zur Darstellung und Messung der Neurotransmitterrezeptoren wurde die quantitative Rezeptorautoradiographie verwendet. Hierbei bedient man sich der Wechselwirkung zwischen einem radioaktiv markierten Liganden L^* mit dem Rezeptor R . Es kommt zur Ausbildung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes RL^* .



Die im Anschluss ermittelte Radioaktivität entspricht der totalen Bindung b_t . Sie besteht aus zwei Anteilen, der spezifischen Bindung des Liganden an den Rezeptor b_{sp} sowie der unspezifischen Bindung b_u an Proteine, Zellgewebe u.ä.

$$b_t = b_{sp} + b_u$$

In einzelnen Experimenten kann die Größe der unspezifischen Bindung ermittelt werden, indem man bei gleichen Versuchsbedingungen einen großen Überschuss von unmarkierten Liganden (I) der Reaktionsmischung zusetzt. Es kommt zu einer Konkurrenz des Radioliganden und des unmarkierten Liganden an der Rezeptorbindungsstelle. Der Radioligand wird in Folge des Überschusses des unmarkierten Liganden fast vollständig von den Rezeptorbindungsstellen verdrängt. Die im Anschluss vermessene Radioaktivität entspricht der unspezifischen Bindung (Büfing Kamden 2000, Repke und Liebmann 1987).



wenn $[I] \gg [L^*]$; dann $[RI] \gg [RL^*]$

3.5.2 Durchführung der Rezeptorautoradiographie

Die Durchführung der Rezeptorligandbindung erfolgte bei allen Rezeptorsubtypen nach dem gleichen Procedere. Die bei -20°C gelagerten Hirnschnitte wurden aufgetaut und an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte eine Präinkubation in Pufferlösung, um endogene Liganden auszuwaschen. Es schloss sich die Inkubation mit dem geeigneten Radioliganden an. Hierbei wurden die Hirnschnitte auf den Objektträgern mit dem Inkubationspuffer überschichtet und in feuchten Kammern inkubiert. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung in Parallelexperimenten wurde dem Inkubationspuffer ein unmarkierter Rezeptorligand im Überschuss zugesetzt. Zum Reaktionsstopp und Auswaschen des noch ungebundenen Radioliganden erfolgte die Spülung der Schnitte in eiskaltem Puffer. Abschließend wurden die Hirnschnitte im Luftstrom getrocknet. Eine Übersicht über die verwendeten Radioliganden, unmarkierten Rezeptorantagonisten, Puffer und Inkubationszeiten ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Übersicht zu den Reaktionsbedingungen der Rezeptorautoradiographie

	M₁-mAChR	nAChR	GABA_A-R	NMDA-R
Präinkubation	3x5min; in Puffer	15min	3x5min; in eiskaltem Puffer	1x45min; bei 4°C
Radioligand	[³ H]-Pirenzepin	[³ H]-Epibatidin	[³ H]-Muscimol;	[³ H]-MK-801
Eingesetzte Konzentration	10,5nM	0,8nM	34nM	10nM
Puffer und Inkubation	N-K-P-Puffer 10mM; pH7,4 60min; RT in feuchter Kammer	Tris, 50mM; NaCl, 120mM; KCl, 5mM, CaCl ₂ , 2,5mM MgCl ₂ , 1mM 90min RT	Tris-Citrat Puffer; 50mM CaCl ₂ ; 2,5mM 30min; bei 4°C	Tris-Acetat Puffer; pH7,4; 50mM 4°C 120min; RT in feuchter Kammer
Blocker	Atropin; 50µM	L-Nikotin 300mM	GABA; 100µM	(+) MK- 801- Hydrogen- maleat
Spülung	2x1min; im kaltem Puffer pH7,4	2x2min in eiskaltem Tris-Puffer, kurzes Tauchen in eiskaltem H ₂ O	3x3sec.in eiskaltem Puffer; Kurzes Tauchen in Glutaraldehyd in Aceton, 50g/500ml Aceton	kurzes Tauchen in eiskaltem Puffer; Pufferwechsel; 80min in eiskaltem Puffer
Exposition (Tage)	98	165	294	99

Die getrockneten Gewebeschnitte wurden zusammen mit kommerziell erhältlichen Radioaktivitätsstandards ([³H]-Microsale, Amersham) auf [³H]-sensitiven Filmen ([³H]-Hyperfilm, Amersham) exponiert. Die Exposition der Filme erfolgte bei 4°C in Röntgenkassetten (Kodak) für 14 Tage bis 42 Wochen. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit Kodak D 19 für fünf Minuten bei 20°C.

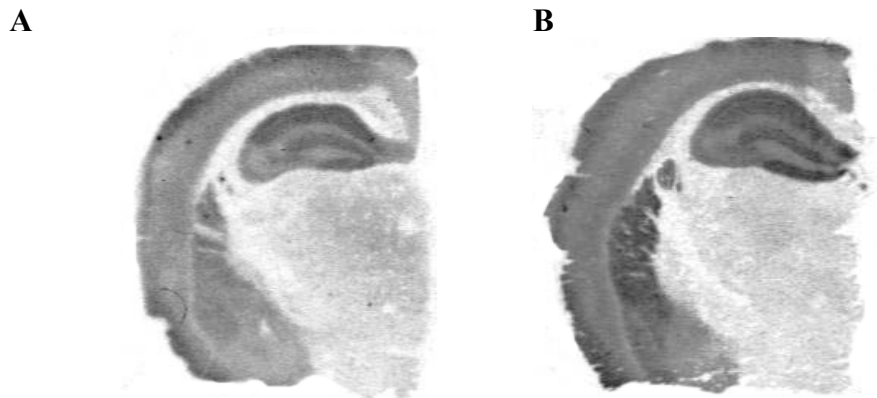


Abb. 4: Repräsentative Autoradiogramme der M_1 -mAChR-Rezeptorbindung von [3H]-Pirenzepin inkubierten Hirnschnitten (Bregma $-1,94$ mm). (A) WT-Maus, (B) $P2Y_1$ -R-defiziente Maus

3.5.3 Auswertung der Autoradiogramme

Die quantitative Auswertung der Autoradiogramme erfolgte unter Anwendung des computergestützten Bildanalysesystems und Nutzung des Softwarepaketes MCID 4.0 (Imaging Research Inc.). Dazu wurden die Autoradiogramme zunächst mittels Videokamera unter standardisierten Beleuchtungsverhältnissen aufgenommen und digitalisiert.

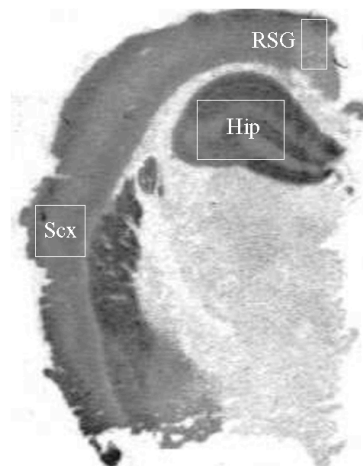
[3H]-Microscale Standards, die gleichzeitig mit den radioaktiv markierten Hirnschnitten unter [3H]-sensitiven Filmen exponiert wurden, dienten der Kalibrierung der Grauwerte (optische Dichte). Aus der Radioaktivität des Gewebestandards (KBq/mg Gewebeäquivalent) und aus der densitometrisch festgestellten optischen Dichte der betrachteten Autoradiogramme wurde eine Kalibrierungskurve aufgenommen. Somit konnte die Dichte der Rezeptorbindung aus den Grauwerten der untersuchten Areale bestimmt werden. Die Rezeptordichten wurden in fmol spezifische Bindung per mg Gewebe angegeben.

Zur Messung der optischen Dichte in einzelnen Gebieten wurden bewegliche zweidimensionale Boxen auf dem Bildschirm entsprechend der anatomischen Regionen angepasst. Diese angepassten Boxen wurden jeweils viermal in die zu untersuchenden Region gesetzt, ohne dabei angrenzende Areale einzubeziehen. Somit ergaben sich vier Einzelwerte pro Region und Tier. Der mittlere Grauwert der umschriebenen Fläche stellt den Messwert dar.

Es erfolgte eine Korrektur der gewonnen Daten durch Subtraktion der unspezifischen Bindung.

Tab. 2: Übersicht über die vermessenen Hirnregionen in den verschiedenen Ebenen und ihre Abkürzungen

Vermessene Ebenen	Vermessene Hirnregion	Abkürzung
Bregma +2,10 mm bis Bregma -0,94 mm	prälimbischer Kortex	PrL
	primär motorischer Kortex	M1
	sekundär motorischer Kortex	M2
	cingulärer Kortex	Cg
	agranulärer insularer Kortex	AI
	somatosensorischer Kortex	Scx
	Nc. accumbens	Acb
	lateraler Hypothalamus	LH
Bregma -1,06 -3,64 mm	somatosensorischer Kortex	Scx
	Hippocampus	Hip
	retrosplenialer granulärer Kortex	RSG
	lateraler Hypothalamus	LH
	ventromedialer Hypothalamus	VMH
	primär motorischer Kortex	M1
	sekundär motorischer Kortex	M2
	auditorischer Kortex	Au
	visueller Kortex	V
	ventrales Tegmentum	VTa
	Substantia nigra	SNR
	Nc. arcuatus	Arc

**Abb. 5:** Darstellung einiger Regionen, die für die Auswertung der Rezeptorautoradiographie und Acetylcholinesterase-Histochemie verwendet wurden. Bregma -1,94 mm (nach Franklin, 2001).

3.6 Histochemischer Nachweis der Acetylcholinesterase-Aktivität

Zur Bestimmung der Aktivität der AChE wurde die Methode nach Andrä und Lojda (1986) verwendet. Die histochemische Darstellung der AChE erlaubt Aussagen über die regionale Verteilung der AChE *in situ* am ausgewählten Hirnschnitt. Sie beruht auf der kolorimetrischen Bestimmung der AChE-Aktivität (Ellman-Methode, Hawkins und Knittle 1972). Durch Verwendung von Acetylthiocholin als Substrat im Gemisch mit einem Cocktail aus Cu^{2+} -Ionen und Kaliumhexacyanoferrat entsteht ein gelblich-brauner Cu-Thiocholin-Komplex, der sich am Hirnschnitt an den Orten der AChE-Aktivität niederschlägt. Die Intensität der Färbung ist in einem definierten Bereich der Enzymaktivität proportional.

Zunächst wurden die auf Deckgläsern fixierten Gefriermikrotomschnitte, zwecks Entfernung von endogenem Acetylcholin, 3x5 Minuten gespült. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Vorinkubation der luftgetrockneten Hirnschnitte in 100 mM Tris-(hydroxymethyl)-2-aminomethansulfonsäure-Maleat Puffer (Tris-Maleat-Puffer) (pH 5.0) bei 37°C. In der Folge wurden die Schnitte direkt in Reaktionslösung bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

Die Reaktionslösung setzte sich wie folgt zusammen:

- 100 mM Tris-Maleat- Puffer (pH 5.0),
- 400 mM Natrium-Zitrat,
- 120 mM Kupfersulfat
- 160 mM Kaliumhexacyanoferrat
- 0.05% Acetylthiocholinjodid

Um einen Reaktionsstopp herbeizuführen, wurden die Hirnschnitte kurzzeitig in 100 mM Tris-Maleat-Puffer (pH 5.0) getaucht. Die Objektträger wurden kurz in Aqua dest. gespült und dann über eine Alkoholreihe dehydriert und in Entellan eingedeckt.

Die Analyse der AChE-Aktivität erfolgte ebenfalls unter Verwendung des computergestützten Bildanalysesystems sowie des Softwarepaketes MCID 4.0 (Imaging Research Inc.). Dazu wurden die gefärbten Hirnschnitte mittels Videokamera aufgenommen und digitalisiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte analog, wie bereits für die Autographie beschrieben.

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Intensität des histochemischen AChE-Signals mit der Aktivität der AChE-Aktivität über einen weiten Bereich linear korreliert. Auf Grund des Fehlens eines Standards wurden die in einer bestimmten Region ermittelten

optischen Dichten von P2Y₁-R-defizienten Tieren immer auf die entsprechenden Werte von Kontrolltieren bezogen, angegeben als Prozent (%) -Veränderung zur Kontrolle.

3.7 Bestimmung der Acetylcholinesterase (AChE) –Aktivität

Zur radiochemischen Bestimmung der AChE-Aktivität wurde die Methode nach Johnson und Russel (1975) verwendet. Als Substrat wird Acetylcholinjodid eingesetzt. Die katalytische Aktivität der AChE hydrolysiert das markierte [³H]-Acetylcholin in [³H]-Acetat und Cholin. Die Reaktion wird durch Zusatz von Chloressigsäure gestoppt. Das während der Reaktionszeit gebildete [³H]-Acetat wird durch Bestimmung der Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationszählung erfasst. Durch eine Flüssig-flüssig-Extraktionsprozedur wird zwischen dem gebildeten [³H]-Acetat und dem nicht umgesetzten [³H]-Acetylcholin differenziert. Hierfür wird durch Zugabe eines definierten Gemisches von Toluol und Isoamylalkohol zum Inkubationsmedium nach Reaktionsstopp das [³H]-Acetat in die organische Phase extrahiert, während das nicht umgesetzte [³H]-Acetylcholin in der unteren wässrigen Phase verbleibt.

Zur Messung der AChE-Aktivität im Hirn wurden Aliquote des 10%-igen Saccharose-Homogenats aus der linken Hirnhälfte verwendet. Im Reaktionsansatz wurden 70 µl 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 und 20 µl [³H]-Acetylcholinjodid-Substrat gemischt und mit Zugabe von 10 µl Homogenat (1,0 µg Protein/10 µl) die Reaktion gestartet. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopppuffer (1 M Chloressigsäure, 0,5 M NaOH, 2,0 M NaCl) beendet und der Ansatz in Szintillationsgefäße mit 4 ml Szintillator (Toluol-Isoamylalkohol) überführt. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die Radioaktivität in der organischen Phase mittels Flüssigkeitsszintillationszählung erfasst.

Zur Erfassung des Leerwertes wurde das Homogenat durch das entsprechende Volumen mit 0,25 M Saccharose ersetzt.

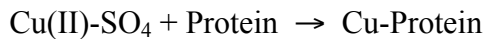
Verwendeter Szintillator:

- 4 g Polyphenylenoxid
- 0,1 g 2,2'-p-Phenyl-bis (5-phenyloxazol)
- 100 ml Isoamylalkohol
- ad 1 l Toluol

Die Enzymaktivität wurde als pro Zeiteinheit gebildetes Acetat berechnet und auf den entsprechenden Proteingehalt des Homogenats im Reaktionsansatz bezogen.

3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Form nach Lowry et al. (1951). Hierbei wird die Eigenschaft von Proteinen ausgenutzt mit einer Cu^{2+} -haltigen Molybdatophosphorsäure eine Farbreaktion einzugehen:



Cu-Protein reduziert Folin Reagens (Molybdatophosphorsäure) \rightarrow Molybdänblau-Reaktion

Die resultierende intensive Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Photometrie genutzt, wobei die bei einer Wellenlänge von 710 nm gemessene Absorption (Extinktion) der Reaktionsmischung im Titerplattenreader Anthos HTIII erfasst wird. Zur Kalibrierung der Farbreaktion wird Rinderserumalbumin als Eichprotein herangezogen (Erstellung einer Eichkurve).

Reaktionsansatz:

Es wurden jeweils 20 μl Probe (10% Hirnhomogenat in 0,25 M Saccharose) in 200 μl C-Lösung gegeben und für zehn Minuten inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 μl Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz und eine weitere Inkubation für 20 Minuten und anschließende Bestimmung der Extinktion im Titerplattenreader.

Die verwendeten Lösungen waren:

- A = 2% Natriumcarbonat in 0,1 M Natronlauge
- B = 0,5% Kupfer(II)-sulfat in 1% Na-Citrat
- C = kurz vor Gebrauch 1 ml B-Lsg. + 49 ml A-Lsg.
- D = Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz

Als Leerwert wurde anstelle des Proteins das entsprechende Volumen von 0,25 M Saccharose eingesetzt. Die gemessenen Extinktionswerte wurden anhand der Eichkurve in Proteingehalt umgerechnet und als $\mu\text{g Protein/ml}$ angegeben.

3.9 Bestimmung der Cholinacetyltransferase (ChAT)-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Cholinacetyltransferase basiert auf der radiochemischen Methode nach Fonnum, bei der tritiummarkiertes Acetyl-Coenzym A und Cholinchlorid

durch die Aktivität des Enzyms zu tritiummarkiertem Acetylcholin umgesetzt wird (Fonnum, 1975). Die Trennung des gebildeten [^3H]-Acetylcholins vom nicht umgesetzten [^3H]-Acetyl-Coenzym A erfolgt durch Extraktion des gebildeten Acetylcholins aus der wässrigen Reaktionsmischung durch Bindung an Kalignost (Natriumtetraphenyl-boron) und Überführung in die organische, den Flüssigkeitsszintillator enthaltende, Phase.

Zunächst wurden 5 μl Hirnhomogenat (Verdünnung des 10%igen Hirnhomogenats auf eine Proteinkonzentration von 1,0 μg Protein/5 μl) bei 37°C fünf Minuten präinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 μl Substratgemisch und eine 20-minütige Inkubation bei 37°C. Durch Ausspülen des Reaktionsgefäßes mit 2,5 ml 10 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7.4) und gleichzeitiger Überführung des gesamten Inhalts in ein Szintillationsgefäß, das 1 ml einer Lösung von Natriumtetraphenylboron (5 mg/ml) in Acetonitril enthielt, wurde die Reaktion gestoppt. Nach Zugabe von 5 ml Toluol-Szintillationscocktail wurden die Gefäße kurz geschüttelt und zur Extraktion des gebildeten [^3H]-Acetylcholins als [^3H]-Acetylcholin-Kalignost-Komplex in die organische Phase ca. 20 Minuten stehen gelassen, während das nicht umgesetzte [^3H]-Acetyl-Coenzym A in der wässrigen Phase verbleibt. Anschließend wurde die Radioaktivität im Betacounter PW4700 (PHILIPS, Hamburg, Deutschland) gemessen.

Als Leerwert wurden anstelle des Hirnhomogenats 5 μl 0,25 M Saccharose mit 0,2% Triton X-100 eingesetzt.

Das Substratgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

- 20 μl [^3H]Acetyl-Coenzym A (spez. Akt. 0,2 Ci/mmol; 0.5 mCi/ml)
- 20 μl 200 mM Cholinchlorid
- 40 μl 2 mM Kaliumchlorid
- 40 μl 200 mM Na-Phosphat, pH 7,4
- 20 μl 4 mM EDTA
- 40 μl 1 mM Eserin (Physostigmin)
- 20 μl Rinderserumalbumin (1 mg/ml)

auffüllen mit Aqua dest. auf 200 μl .

Flüssigkeitsszintillationscocktail

4 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) + 0,1 g POPOP (2,2-p-Phenylen bis-(S-phenyl-oxazol)) gelöst in 1000 ml Toluol.

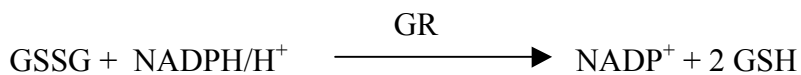
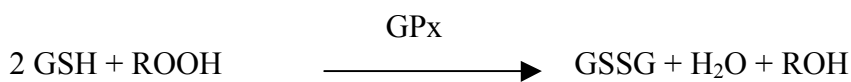
Unter Zugrundelegung der spezifischen Aktivität des eingesetzten [^3H]-Acetyl-Coenzym A (0,2 Ci/mmol) wurde das in 20 Minuten gebildete Acetylcholin berechnet und die

Enzymaktivität (Umsatz/Zeiteinheit) auf den entsprechenden Proteingehalt im Reaktionsansatz bezogen.

3.10 Bestimmung der Glutathionperoxidase (GPx)-Aktivität

Die Enzymaktivität der Glutathion-Peroxidase wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits der Firma Oxis Research® (Portland, USA) bestimmt und beruht methodisch auf einem indirekten Messprinzip, wie bei Paglia und Valentine (1967) beschrieben.

Die Glutathionperoxidase (GPx) katalysiert die Oxidation von Glutathion (GSH) durch Peroxide (ROOH, z.B. tert-Butylperoxid), wobei das oxidierte Glutathion (GSSG) in Gegenwart von Glutathionreduktase (GR) sofort reduziert und NADPH₂ oxidiert wird.



Der NADPH-Verbrauch kann photometrisch bestimmt werden und korreliert mit der Glutathionperoxidase-Aktivität, da die erste Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die Oxidation von NADPH zu NADP⁺ ist mit einer Verringerung der Absorption bei 340 nm verbunden und ist damit ein Maß zur Verfolgung der Oxidation von Glutathion.

Die Aktivität der GPx wurde im zytosolischen Kompartiment des hergestellten 10%igen Hirnhomogenats (s. Pkt. 3.4.3) erfasst. Hierbei wurden Aliquote der Homogenate einer 30-minütigen Zentrifugation bei 10.000 g ausgesetzt und der Überstand für die Aktivitätsbestimmung herangezogen.

Die Messung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers, so dass die Reaktionsansätze nach Herstellerangaben pipettiert und die Reaktion über einen Zeitraum von drei Minuten im Intervall von 15 s verfolgt wurde. Die Anstiege aus der graphischen Auftragung der kinetischen Daten (Absorption A₃₄₀ gegen Zeit) wurden um den Leerwert (dest. Wasser anstelle des Homogenats) korrigiert und mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes konnte aus der Oxidation von NADPH auf die GPx-Aktivität geschlossen werden:

$1 \text{ mU/ml} = 1 \text{ nmol NADPH/min/ml} = (A_{340}/\text{min})/0,00622$ (Der Faktor 0,00622 entspricht dem Extinktionskoeffizienten unter Berücksichtigung der Schichtdicke der Küvette (1cm; Literaturwert)).

Nach Korrektur der Verdünnungen und unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration wurde die GPx-Aktivität in mU pro mg Protein angegeben.

3.11 Bestimmung der reaktiven N-Spezies (NO, Nitrit)

Das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert die Oxidationsreaktion von L-Arginin in L-Citrullin. Das dabei entstehende Stickstoffmonoxid (NO) reagiert sofort weiter zu Nitrit (NO_2) und Nitrat (NO_3).

Um die Menge an NO und NO_2 im Zytosol von Hirngewebe zu messen, wurde eine photometrische Methode nach Griess (1879) herangezogen. Das Messprinzip dieser Methode beruht auf einer Azokupplung von Nitrit an ein Naphthylethylendiamin und der spektrophotometrischen Quantifizierung dieser Farbreaktion. Es handelt sich dabei um eine Zweistufenreaktion: Zunächst erfolgt die NO-Messung. Die anschließende Messung des Nitrits ist abhängig vom pH-Wert, deshalb erfolgt die zweite Messung in Anwesenheit von Phosphorsäure zur pH-Absenkung.

Der Gehalt an NO und Nitrit wurde im zytosolischen Kompartiment der hergestellten 10%igen Hirnhomogenate (s. Pkt. 3.4.3) bestimmt. Hierbei wurden Aliquote der Homogenate einer 30-minütigen Zentrifugation bei 10.000 g ausgesetzt und der Überstand für die Aktivitätsbestimmung herangezogen.

In eine Quarz-Küvette wurden 860 μl Reaktions-Puffer und 40 μl der zytosolischen Fraktion des Hirnhomogenats gemischt. Nach drei Minuten erfolgte die Messung der Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 496 nm zur Erfassung des NO-Gehaltes. Danach wurden 10 μl 85%ige Phosphorsäure (H_3PO_4) hinzugegeben und nach 15 Minuten im Photometer erneut die Absorption, aber bei einer Wellenlänge von 540 nm ermittelt (Maß für den Nitritgehalt). Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

Reaktionspuffer:

- 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,4
- 17 mM Sulfanilsäure
- 0,4 mM Naphthylethylendiamindihydrochlorid (NEED)

Die Berechnung des NO-Gehalts wurde gemäß des Lambert-Beerschen Gesetzes durchgeführt.

$$E = \epsilon * c * d$$

(E, Extinktion; c, Konzentration in μM ; d, Schichtdicke der Küvette; ϵ , Extinktionskoeffizient)

Bei der Berechnung des NO-Gehaltes wurde ein Extinktionskoeffizient aus der Literatur herangezogen: $\epsilon = 6,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ridnour et al., 2000)

Bei der Berechnung des Nitritgehaltes wurde der Extinktionskoeffizient experimentell ermittelt. Hierbei wurde aus der Abhängigkeit von gemessener Extinktion und dazugehöriger Natriumnitritkonzentration unter Zugrundelegung des Lambert-Beerschen Gesetzes der Extinktionskoeffizient, ϵ , aus dem Anstieg der Kurve ermittelt (siehe Abb. 6). So konnte ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 36,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ abgeschätzt werden, der für die weitere Bestimmung des Nitritgehaltes in den Experimentalproben herangezogen wurde. Der so gemessene Gehalt an NO und Nitrit wurde auf den entsprechenden Proteingehalt des Homogenats im Reaktionsansatz bezogen.

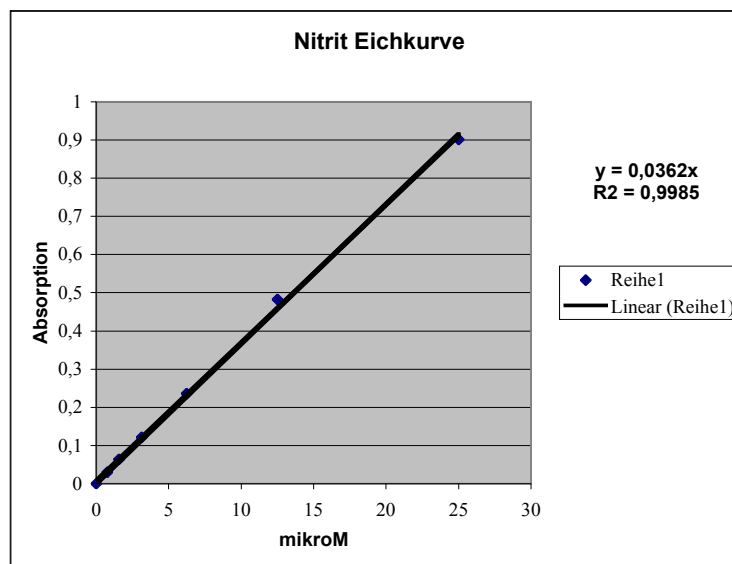


Abb. 6: Darstellung der Abhängigkeit von gemessener Extinktion und dazugehöriger Konzentration an Natriumnitrit zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten (ϵ) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. R^2 , Regressionskoeffizient.

3.12 Western Blot-Analyse zur Erfassung des Amyloidvorläuferproteins (APP)

3.12.1 Gewebeaufbereitung

Zum Nachweis des APP mittels Gelelektrophorese wurde ein Aliquot des 10%igen Saccharose-Homogenats aus der linken Hirnhälfte verwendet, welches mittels Ultrazentrifugation in Überstand und Membranfraktion getrennt wurde, um einerseits die durch Sekretasen gespaltene extrazellulären Fragmente (sAPP) im Überstand und andererseits das membranständige APP (mAPP) nachzuweisen.

Dazu wurde dem Homogenat gleiches Volumen Homogenisierungspuffer (0,1 M TBS, 2 Tabletten CompleteTM Proteaseinhibitoren (BOEHRINGER Mannheim) ad 100 ml A. bidest, pH 7,4) zugegeben und bei -4°C für 1 h bei 50.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Das Sediment wurde mit dem gleichen Volumen TBS resuspendiert, anschließend durch Ultraschall homogenisiert und bei -4°C für 1 h bei 50.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Das erhaltene Sediment wurde mit 0,1 M TBS und Detergenzien (0,1 M TBS, 1% Triton X-100, 1% Nomidet P40, pH 7,4) versetzt, durch Ultraschall homogenisiert, bei RT für 30 Minuten stehen gelassen und ein letztes Mal bei -4°C für 1 h bei 25.000 g zentrifugiert. Das nun erhaltene Sediment, was im Wesentlichen die rohe Membranproteinfraktion enthält, wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihren Molekulargewichten erfolgte in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (1970) in einem 1,5 mm dicken 10%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel. Die Komponenten für den Polymerisationsansatz der verwendeten Gele sind in Tab. 3 aufgelistet. Die Proben wurden in Ladepuffer (125 mM Tris-HCl, 20% Glycerol, 4% SDS, 10% Mercaptoethanol, 0,0005% Bromphenolblau, pH 6,8) auf eine Konzentration von 10 µg Protein pro 10 µl Lösung zum Nachweis des APP verdünnt. Vor dem Auftragen erfolgte eine Denaturierung der Proben für fünf Minuten bei 95°C.

Tabelle 3: Zusammensetzung der für die Gel-Elektrophorese verwendeten Gele

Lösungen	Trenngel 10%	Sammelgel 4%
Wasser	4ml	3,01ml
8,8 Tris 6,8	2,5ml	1,25ml
Bisacryl	3,35ml	0,66ml
10% SDS (Roth)	100µl	50µl
TEMED (Tetraethylmethyldiamin)	5µl	5µl
10% Amoniumpersulfat)	50µl	25µl

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Mini-Protean-Kammer (BIORAD, München) mittels Elektrodenpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glyzin, 1%SDS, pH 8,3) bei einer Geschwindigkeit von 10V/cm im Sammelgel und 20 V/cm im Trenngel. Die Gesamtlauzeit betrug zwischen 45 und 60 Minuten. Als Standard zur Verifizierung der Größe der aufgetrennten Proteine wurden zusätzlich 3 µl eines "prestained low-range“-Proteinstandards aufgetragen, der den Molekulargewichtsbereich von 21- 130 kDa abdeckte.

3.12.3 Westernblotting und Immunodetektion

An die PAGE schloss sich der Transfer der negativ geladenen Proteine aus der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran (Protean BA85, Porengröße 45 µm; SCHLEICHER & SCHUELL, Kassel) in einem Tankblotgerät (Trans-Blot Cell, BIORAD, München) an. Der Transferpuffer enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glyzin und 20% Methanol. Der Transfer erfolgte für 90 Minuten bei 50 V unter Wasserkühlung.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulose-Membran zunächst in 4% RSA in 0,1 M TBS, pH 7,4, 0,1% Tween 20 (TBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur gespült. Danach erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper anti-APP (Klon 22C11; Verdünnung 1:1000; CHEMICON) unter leichtem Schaukeln in der Blockierungslösung für 2 h bei Raumtemperatur auf einer Taumel. Zur Verifizierung der eingesetzten Proteinmenge (interner Proteinstandard) wurde gleichzeitig ein gegen endogenes β -Actin gerichteter monoklonaler Antikörper (monoklonales Maus-anti- β -Aktin, Verdünnung 1:1000; Sigma) eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen der Membranen, für je fünf Minuten in TBST, schloss sich die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Maus-Peroxidase gekoppelt, Boehringer Mannheim; Verdünnung 1:1000 in der Blockierungslösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur an. Zur Visualisierung der Peroxidaseaktivität wurde die Diaminobenzidin (DAB) Farbreaktion herangezogen, wobei

das eingesetzte farblose monomere 3,3'-Diamino-Benzidintetrahydrochlorid durch die katalytische Aktivität der Peroxidase des sekundären Antikörpers polymerisiert und als braunes Farbprodukt sichtbar wird:

- 5 min in DAB-Puffer (0,05 M TB: 6,057 g Tris und 9,0 g NaCl ad 1 l bidestilliertes Wasser, pH 7,6) äquilibrieren
- bis zur ausreichenden Farbreaktion (ca. 20-30 sec.) in die Reaktionslösung (4 mg DAB, 10 µl H₂O₂, 10 ml 0,05 mM TB) legen
- Abstoppen der Farbreaktion durch mehrmaliges Spülen in bidestilliertem Wasser

3.12.4 Auswertung der Immunblots

Zur Auswertung der Blots wurden die Membranen mittels eines Flachbettscanners (EPSON Perfection 1670) digitalisiert und die Banden densitometrisch anhand des Softwarepaketes TINA (Software 2.09, RAYTEST Isotopenmeßgeräte, Berlin) ausgewertet. Dabei wurde die relative Summe der Grauwerte jeder Probe durch Subtraktion der Hintergrundfärbung der Membran von der Summe der Grauwerte der zugehörigen Bande ermittelt.

Zur Korrektur von eventuellen Abweichungen der aufgetragenen Proteinmenge erfolgte eine Normalisierung gegen β -Aktin, um die Proteinvariation auszugleichen. Die normalisierten Intensitäten wurden auf den Wildtyp bezogen und auf 100% gesetzt.

Die Auswertung ist als semiquantitativ zu betrachten.

3.13 Statistische Analyse

Zur Feststellung von Unterschieden der neurochemischen Parameter zwischen Hirnarealen des Wildtyps und den P2Y₁-R-defizienten Mäusen wurde der t-Test angewendet. Bei Nichtvorliegen einer Normalverteilung wurde, unter Verwendung des Softwarepaketes Sigma Stat/Plot, der Mann-Whitney-U-Test benutzt. Unterschiede zwischen den Tieren wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn $P < 0,05$ war.

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es am Tiermodell der P2Y₁-R-defizienten Maus zu untersuchen, ob Defizite in der Expression des P2Y₁-R zu Veränderungen in ausgewählten Neurotransmissionssystemen bzw. zur Induktion von oxidativem Stress in definierten Hirnregionen führen. Diese Fragen sollten mit Hilfe von biochemischen und autoradiographischen Untersuchungen von Hirnmaterial aus P2Y₁-R-defizienten Mäusen im Vergleich mit entsprechender Datenerhebung an altersgerechten Wildtyp (WT)-Mäusen beantwortet werden.

Es erfolgte zunächst die histochemische Charakterisierung der regionalen Verteilung der Aktivität der AChE an ausgewählten Hirnschnitten von adulten P2Y₁-R-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollschnitten.

Die biochemische Charakterisierung der Hirne von P2Y₁-R-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen wurde anschließend mittels radiochemischer Erfassung der Aktivitäten der ChAT und AChE sowie der Expression der muskarinischen M1- und nikotinischen ACh-R, der GABA_A- und NMDA-R mittels Rezeptorautoradiographie quantifiziert.

Das Auftreten von oxidativem Stress wurde durch Erfassung der Aktivität der Glutathionperoxidase und durch Abschätzung des Auftretens von reaktiven Stickstoffspezies erfasst.

Weiterhin wurde mittels semiquantitativer Western Blot-Analyse der Frage nachgegangen, ob die Abwesenheit von P2Y₁-R die Expression des Amyloidvorläuferproteins beeinflusst.

4.1 Das cholinerge Transmissionssystem

Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob Defizite in der P2Y-Rezeptorexpression die Entwicklung der cholinergen Neurotransmission beeinflussen. Hierfür wurden cholinerge Marker, wie ChAT, AChE sowie muskarinische und nikotinische ACh-Rezeptoren im Hirngewebe von WT- und P2Y₁-R-defizienten Mäuse erfasst.

4.1.1 Die Acetylcholinesterase

Die AChE ist das abbauende Enzym des Acetylcholins und hydrolysiert Acetylcholin im synaptischen Spalt cholinergner Neuronen. Die AChE wurde sowohl im Homogenat

radiochemisch als auch an Hirnschnitten histochemisch zur Erfassung der räumlichen Verteilung vermessen.

4.1.1.1 Histochemische Erfassung der Acetylcholinesterase-Aktivität

Die histochemische Darstellung erlaubt Aussagen über die regionale Verteilung der AChE in situ am ausgewählten Hirnschnitt. Repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 7 dargestellt.

Die visuelle Inspektion der histochemischen Verteilung der AChE am Hirnschnitt zeigte die höchste Aktivität der AChE im Corpus striatum, Nc. accumbens sowie im ventromedialen Hypothalamus. Mittlere Aktivitäten wurden in der Substantia nigra, dem lateralen Hypothalamus, Hippocampus und im agranulären insularen Kortex beobachtet. Die kortikalen Regionen zeigten eine weniger stark ausgeprägte, aber laminare Verteilung AChE-Aktivität (Abb. 7).

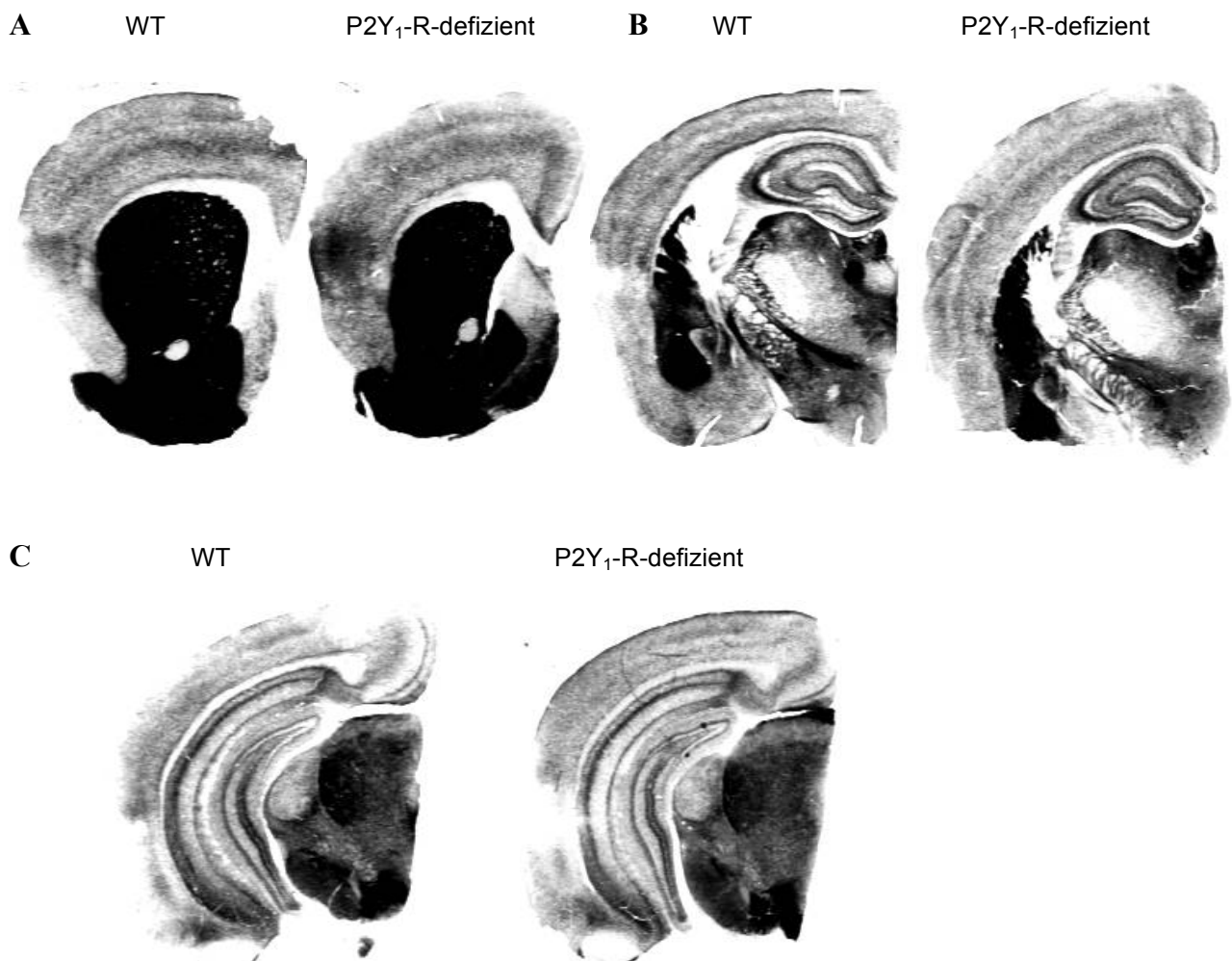


Abb. 7: AChE-Histochemie an exemplarischen Hirnschnitten von WT- und P2Y₁-R-defizienten Mäusen in drei rostro-caudalen Schnittebenen. A: Bregma 0,98 mm; B: Bregma -1,94 mm; C: Bregma -3,08 mm.

Die AChE-Präparate wurden mittels quantitativer Bildanalyse densitometrisch ausgewertet, unter der Annahme, dass die Intensität der Färbung (optische Dichte) mit der Stärke der Enzymaktivität korreliert (siehe Methodenteil Pkt. 3.6).

Die herangezogenen Hirnregionen, die mit PC-gestützter Bildanalyse ausgewertet wurden, sind in Tabelle 4 aufgeführt. Es wurden hierfür Hirnschnittpräparate von fünf P2Y₁-R-defizienten Mäusen und fünf WT-Mäusen untersucht. Die AChE-Präparate der P2Y₁-R-defizienten Mäuse wurden mit der Bildanalyse densitometrisch ausgewertet und ließen, im Vergleich zu ihren entsprechenden WT-Kontrollen, signifikante Unterschiede nur in der Substantia nigra und dem Nc. arcuatus erkennen (Abb. 8).

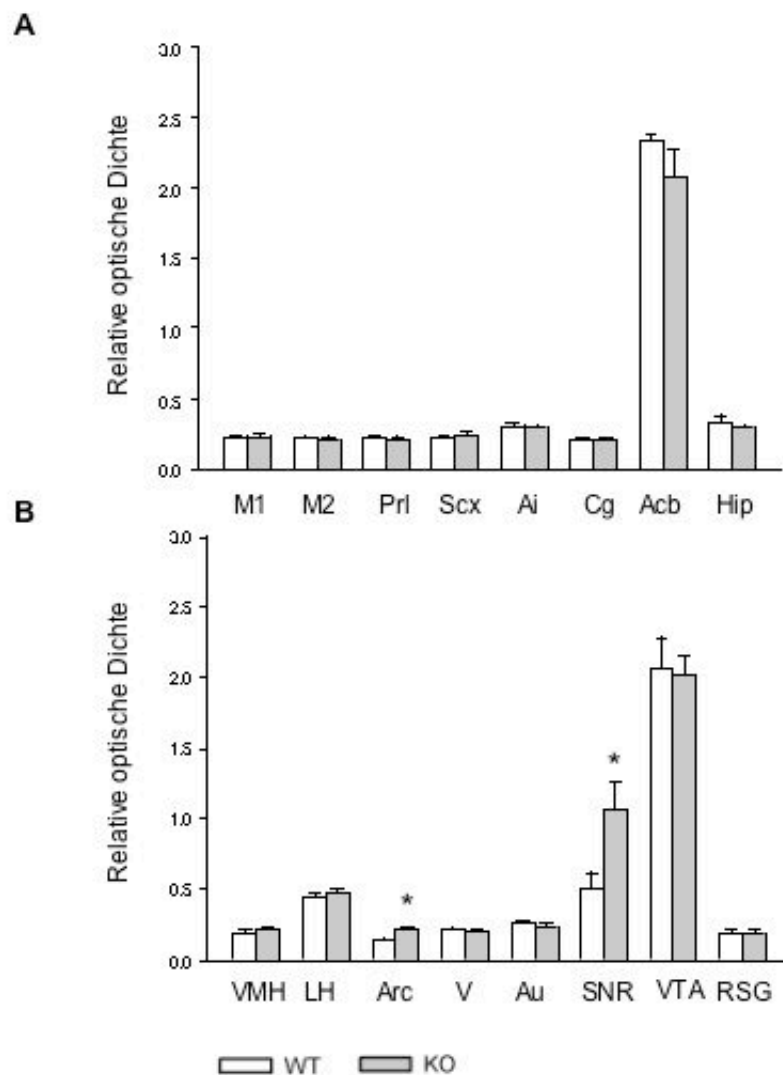


Abb. 8: A+B: Vergleich der mittels Densitometrie erfassten optischen Dichten der AChE-Färbung in ausgewählten Hirnregionen der WT-Mäuse (weiße Säulen) und P2Y₁-R-defizienten Mäuse (KO, graue Säulen). Die angegebenen Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von je 5 Tieren. Die densitometrisch ausgewerteten AChE-Präparate der P2Y₁-R-defizienten Mäuse ließen im Vergleich zu ihren entsprechenden WT-Kontrollen einen signifikanten Unterschied der Enzymaktivität in Arc und SNR erkennen. $P < 0,05$; Abkürzungen, siehe Tabelle 2.

4.1.1.2 Radiochemische Erfassung der Acetylcholinesterase-Aktivität

Die AChE-Aktivität wurde zusätzlich auch in Hirnhomogenaten von P2Y₁-R-defizienten Mäusen und WT-Mäusen mittels einer radiochemischen Methode ermittelt.

Die radiochemisch bestimmte Aktivität der AChE im Gesamthirn von WT-Mäusen betrug 934 ± 23 nmol/h/mg Protein (N=4), während für die Aktivität der AChE im Gesamthirn von P2Y₁-R-defizienten Mäusen eine Enzymaktivität von 826 ± 76 nmol/h/mgProtein (N=4)

gefunden wurde. Die Enzymaktivitäten in den WT und KO waren nicht signifikant verschieden.

4.1.2 Die Cholinacetyltransferase

Die ChAT ist das Syntheseezym des Acetylcholins, das in cholinergen Neuronen lokalisiert ist und aus Coenzym A und Cholin Acetylcholin bildet.

4.1.2.1 Radiochemische Erfassung der Cholinacetyltransferase-Aktivität

Die ChAT-Aktivität wurde in Homogenaten aus dem Gesamthirn von WT- und P2Y₁-R-defizienten Mäusen radiochemisch bestimmt.

Die gemessene Aktivität der ChAT in Hirnhomogenaten von WT-Mäusen betrug $34 \pm 1,3$ nmol/h/mg Protein (N=4) und unterschied sich nicht von der Enzymaktivität, die in Hirnhomogenaten von P2Y₁-R-defizienten Tieren ($37,0 \pm 6,3$ nmol/h/mgProtein; N=4) gemessen wurde.

4.1.3 M1-muskarinischer Acetylcholinrezeptor (M1-mAChR)

Zur Erfassung von Veränderungen des Verteilungsmusters der M1-mAChR wurde die Radioligand-Bindungstechnik unter Verwendung des M1-mAChR-spezifischen Radioliganden [³H]-Pirenzepin herangezogen und die erhaltenen Autoradiogramme densitometrisch ausgewertet. Um ein Screening nach M1-mAChR-Veränderungen bei den P2Y₁-R-defizienten Mäusen im gesamten Gehirn zu ermöglichen, wurden solche Schnittebenen für die Rezeptorautoradiographie ausgewählt, die Regionen mit bekannter Expression von P2Y₁-R enthielten (s. Tabelle 2).

In WT-Mäusen wurde die höchste Dichte der M1-mAChR im prälimbischen Kortex und im Nc. accumbens gefunden (347 ± 87 fmol/mg bzw. 343 ± 52 fmol/mg). Mittlere Rezeptordichten von ca. 201 bis 261 fmol/mg wurden in den Regionen primär motorischer und sekundär motorischer Kortex, somatosensorischer Kortex, agranulärer insularer Kortex, cingulärer Kortex, Hippocampus, visueller Kortex sowie im auditorischen Kortex beobachtet. In den Regionen ventromedialer Hypothalamus und im Nc. arcuatus wurde nur eine geringe Bindung von ca. 20 bis 34 fmol/mg ermittelt. Die Regionen Substantia nigra und ventrales Tegmentum wurden von der Auswertung ausgenommen, da nicht genügend Hirnschnitte zur Verfügung standen, die diese Hirnregionen umfassten.

Bei den P2Y₁-R-defizienten Mäusen konnte im ventromedialen Hypothalamus eine um 57% ($P < 0,05$) niedrigere Rezeptordichte im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden. In den übrigen analysierten Regionen konnten keine Unterschiede in der M1-mAChR-Dichte im Vergleich zu den Wildtypen gefunden werden (siehe Abb. 9).

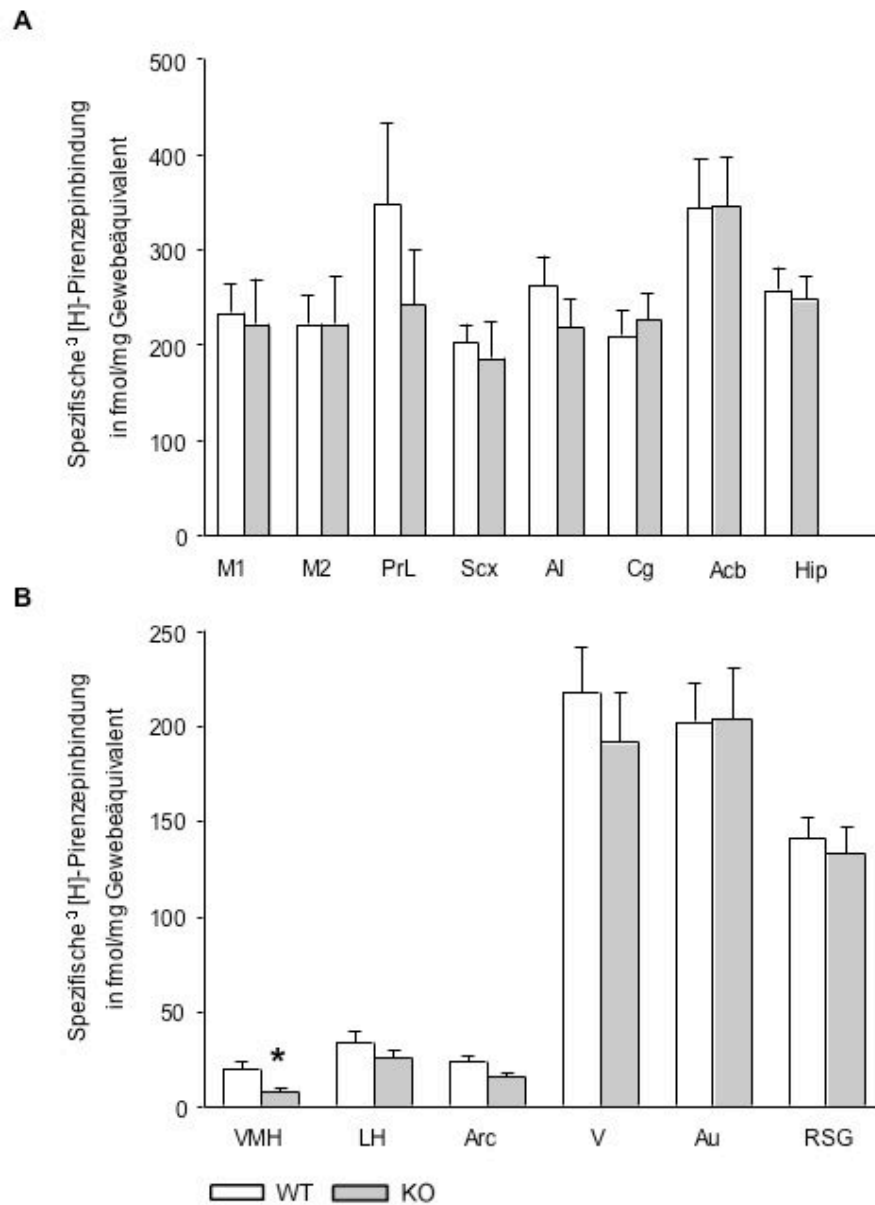


Abb. 9: A+B: Vergleich der M1-mAChR-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von P2Y₁-R-defizienten Mäusen (KO, graue Säulen) und Kontrollmäusen (WT, weiße Säulen), die mittels quantitativer Rezeptorautoradiographie unter Verwendung des spezifischen Radioliganden [³H]-Pirenzepin ermittelt wurden. Bei den P2Y₁-R-defizienten Mäusen konnte im ventromedialen Hypothalamus (VMH) eine um 57% ($P < 0,05$) niedrigere Rezeptordichte im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden.

Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 5 Tieren je Gruppe. Abkürzungen, siehe Tabelle 2.

4.1.4 Nikotinischer Acetylcholinrezeptor (nAChR)

Ähnlich wie für den M1-mAChR wurde zur Erfassung von Veränderungen des Verteilungsmusters der nAChR die quantitative Rezeptorautoradiographie unter Verwendung von [³H]-Epibatidin, der alle neuronalen nAChR des Subtyps $\alpha 2\beta 3$ nachweist, herangezogen. Bei den WT-Tieren wurden hohe Ligand-Bindungen im retrosplenialen Kortex ($63 \pm 9,5$ fmol/mg) registriert. Mittlere Rezeptordichten von ca. 30 bis 50 fmol/mg wurden im Nc. accumbens, cingulären Kortex, motorischen Kortex, im somatosensorischen und agranulären insularen Kortex beobachtet. In den hypothalamischen Strukturen, im Nc. arcuatus, im Hippocampus und im ventralen Tegmentum wurden Bindungen zwischen 24 und 27 fmol/mg gemessen. In den übrigen untersuchten Hirnregionen fanden sich nAChR-Bindungsdichten unter 20 fmol/mg Protein inklusive der Substantia nigra.

Die Bindung von [³H]-Epibatidin am nACh-R zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und P2Y₁-R-defizienten Mäusen in den untersuchten Regionen (Abb.10).

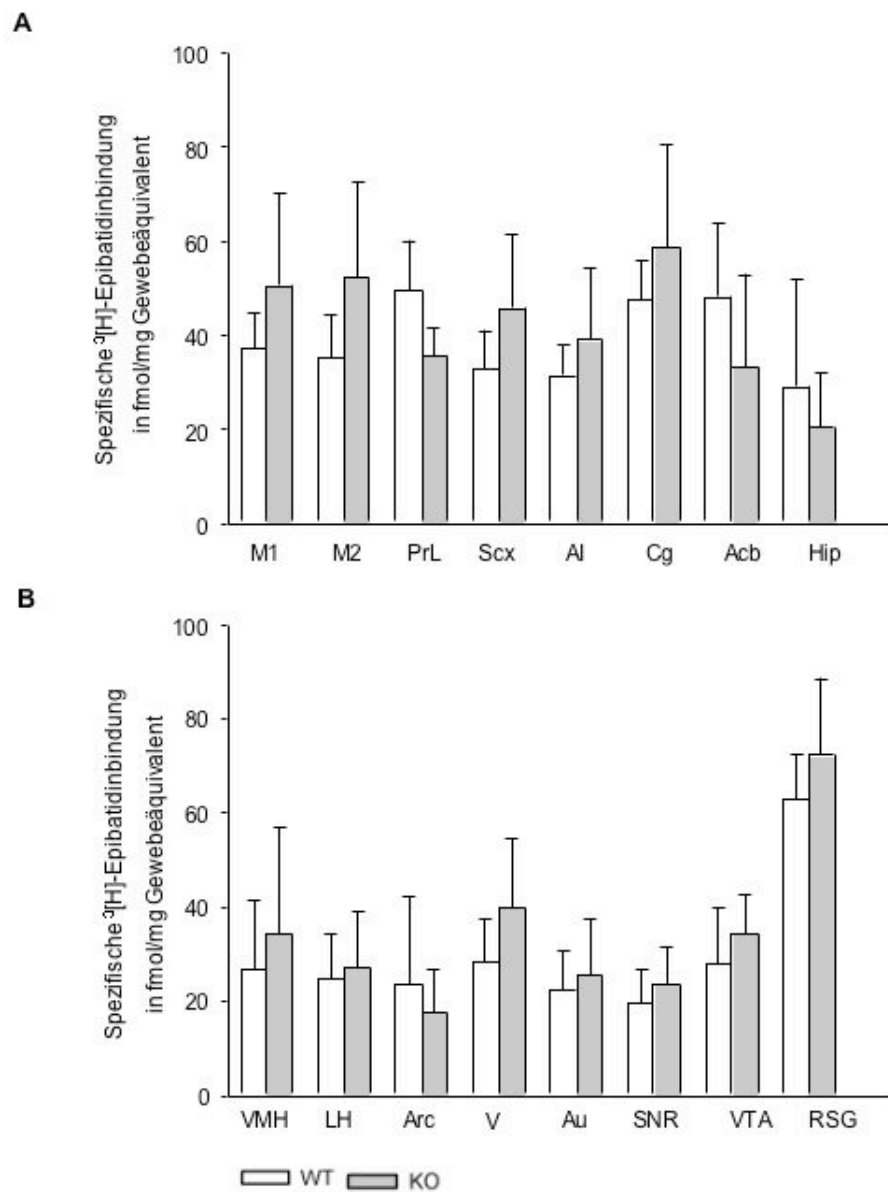


Abb. 10: A+B: Vergleich der nAChR-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von P2Y₁-R-defizienten Mäusen (KO, graue Säulen) und Kontrollmäusen (WT, weiße Säulen), die mittels quantitativer Rezeptorautoradiographie unter Verwendung des spezifischen Radioliganden [³H]-Epibatidin ermittelt wurden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und P2Y₁-R-defizienten Mäusen in den untersuchten Regionen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus je 5 Tieren pro Gruppe. Abkürzungen, siehe Tabelle 2.

4.1.5 GABAerges Transmittersystem: GABA_A-Rezeptor

Zur Erfassung der Verteilung des GABA_A-R am Hirnschnitt mittels quantitativer Rezeptorautoradiographie kam [³H]-Muscimol als spezifischer Radioligand zu Anwendung (34 nM).

Die densitometrische Auswertung der Autoradiogramme der Hirnschnitte aus WT-Mäusen ergab die höchsten Dichten (von ca. 200 bis 133 fmol/mg) der GABA_A-R in kortikalen Regionen: primär motorischer Kortex, sekundär motorischer Kortex, prälimbischer Kortex, somatosensorischer Kortex und der retrospleniale Kortex. Geringere Rezeptordichten wurden im agranulären insularen Kortex und in der Substantia nigra beobachtet.

Beim Vergleich der regionalen GABA_A-Rezeptorbindung zwischen Wildtyp- und P2Y₁-R-defizienten Mäusen kommt es zu erkennbaren Unterschieden. So konnte eine signifikant erhöhte Rezeptorbindung im cingulären Kortex um 261% ($P < 0,004$), im Nc. accumbens um 240% ($P < 0,001$), im Hippocampus um 130% ($P < 0,001$), im ventromedialen Hypothalamus um 131% ($P < 0,001$), im lateralen Hypothalamus um 572% ($P < 0,01$), im visuellen Kortex um 105% ($P < 0,001$) sowie im auditorischen Kortex um 111% ($P < 0,001$) an Hirnschnitten von P2Y₁-R-defizienten Mäusen im Vergleich zu entsprechenden Daten der WT-Mäuse beobachtet werden (Abb. 11).

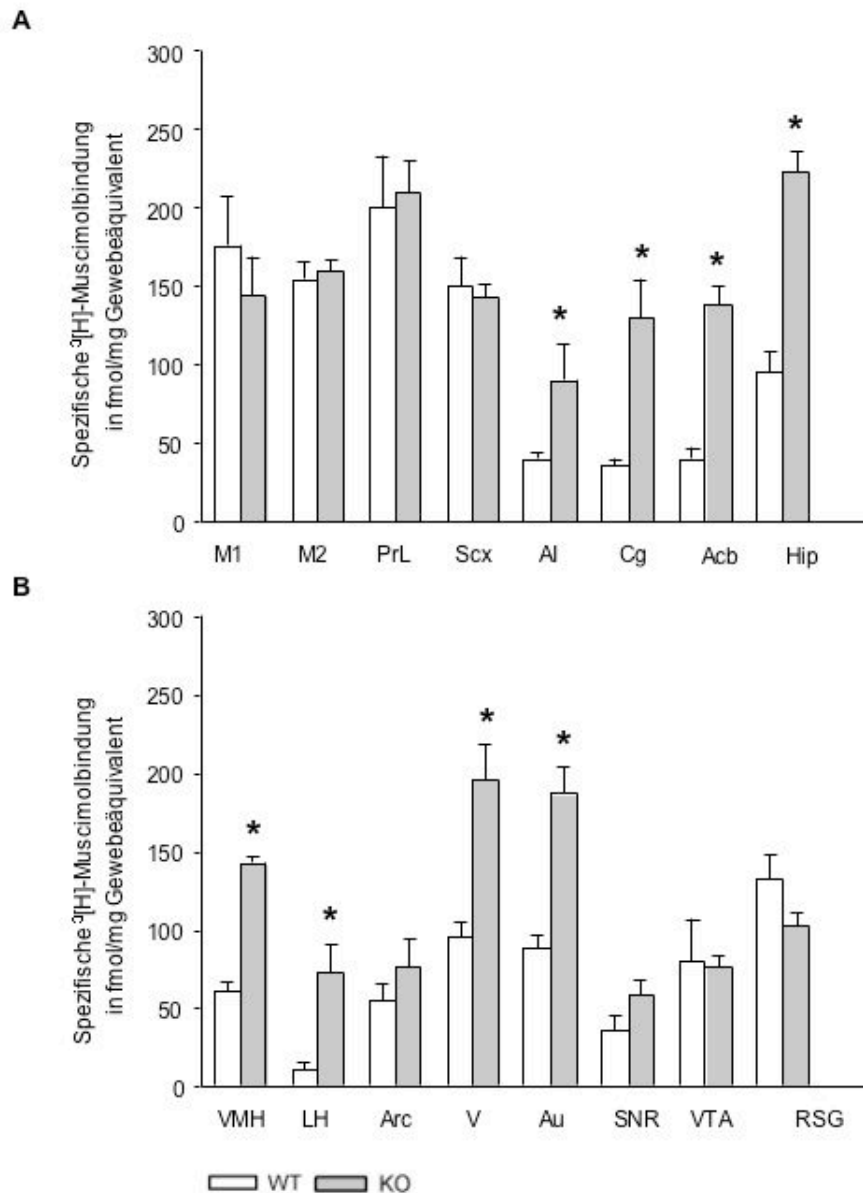


Abb. 11: Vergleich der GABA_A-Rezeptorbindung in ausgewählten Hirnregionen von P2Y₁-R-defizienten Mäusen (KO, graue Säulen) und Kontrollmäusen (WT, weiße Säulen), die mittels quantitativer Rezeptorautoradiographie unter Verwendung des spezifischen Radioliganden [³H]-Muscimol ermittelt wurden. Bei den P2Y₁-R-defizienten Mäusen konnten im AI, Cg, Acb, Hip, VMH, LH, V und Au höhere Rezeptordichten im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus je 5 Tieren pro Gruppe. Abkürzungen, siehe Tabelle 2.

4.1.6 Glutamaterges Transmittersystem: NMDA-Rezeptor

Zur Erfassung der Verteilung des NMDA-R am Hirnschnitt mittels quantitativer Rezeptorautoradiographie kam [³H]-MK-801 als spezifischer Radioligand zu Anwendung. Wie in der Abb. 12 ersichtlich, wurden hohe [³H]-MK-801-Bindungsspiegel im cerebralen

Kortex, einschließlich der hippocampalen Formation (173 ± 25 fmol/mg) an Hirnschnitten von Kontrolltieren gemessen. Mittlere NMDA-Rezeptordichten von ca. 84 bis 41 fmol/mg wurden im retrosplenialen Kortex und im Nc. accumbens beobachtet. Die geringste Dichte des NMDA-R wurde mit 5,5 fmol/mg in den hypothalamischen Regionen gefunden.

Bei den P2Y₁-R-defizienten Mäusen konnten keine Unterschiede in der Rezeptordichte der analysierten Regionen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 12) beobachtet werden.

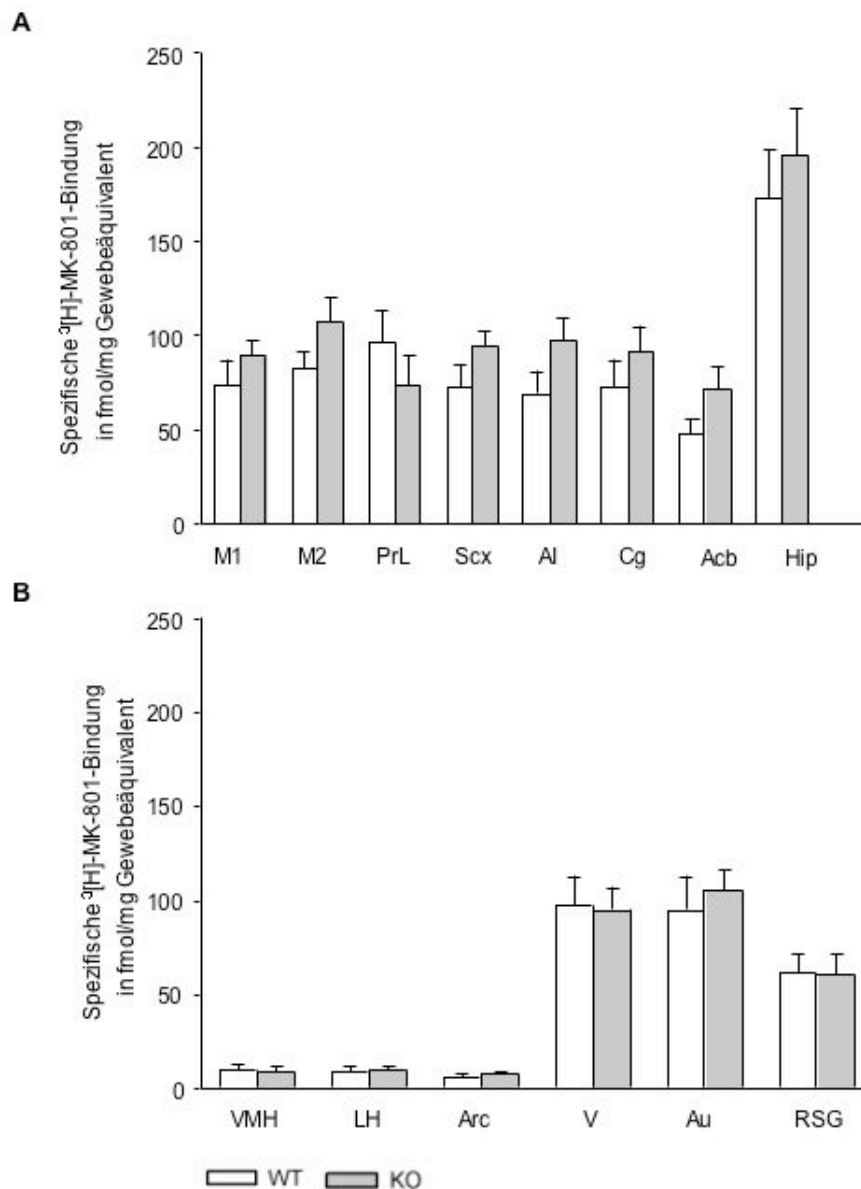


Abb. 12: Vergleich der NMDA-Rezeptorbindung in ausgewählten Hirnregionen von P2Y₁-R-defizienten Mäusen (KO, graue Säulen) und Kontrollmäusen (WT, weiße Säulen), die mittels quantitativer Rezeptorautoradiographie unter Verwendung des spezifischen Radioliganden [³H]-MK-801 ermittelt wurden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und P2Y₁-R-defizienten Mäusen in den untersuchten Regionen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 5 Tieren pro Gruppe. Abkürzungen, siehe Tabelle 2.

4.2 Untersuchung von Biomarkern für oxidativen Stress

4.2.1 Glutathionperoxidase-Aktivität

Die Glutathionperoxidase (GPx) ist ein wichtiges Enzym des antioxidativen Schutzsystems der Zelle. Sie katalysiert die glutathionabhängige Reduktion von Peroxiden.

Um zu klären, ob ein Defizit an P2Y₁-R das „antioxidative Verteidigungssystem“ des Hirns beeinflusst, wurde die Aktivität der GPx in Hirnmaterial von Kontroll- und P2Y₁-R-defizienten Mäusen photometrisch bestimmt.

Die im Hirn von Wildtypmäusen ermittelte Enzymaktivität der GPx betrug $6,92 \pm 0,3$ $\mu\text{mol/min/ml}$ (n=4) und unterschied sich nicht signifikant von der GPx-Enzymaktivität, welche in Hirnmaterial von P2Y₁-R-defizienten Mäusen ($6,80 \pm \mu\text{mol/min/ml}$, N=3) gemessen wurde.

4.2.2 Bestimmung der reaktiven Stickstoff (N)-Spezies im Hirngewebe

Ein weiterer Marker für das Auftreten von oxidativem Stress ist eine erhöhte Produktion von reaktiven Stickstoff-Spezies (NO, Nitrit). Unter Anwendung der Griess-Methode (Griess, 1879) wurde der Gehalt an NO und Nitrit in Hirnmaterial von WT- und von P2Y₁-R-defizienten Mäusen photometrisch bestimmt. Die ausgewerteten und gemittelten Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Dabei zeigt sich im Hirnmaterial der Wildtypiere ein NO-Gehalt von $33,9 \pm 2,5$ $\mu\text{M/mg Protein}$, während der NO-Gehalt im Hirngewebe von P2Y₁-R-defizienten Mäusen 62 ± 28 $\mu\text{M/mg Protein}$ betrug. Die Messung des Nitritgehaltes in Hirnhomogenaten von Wildtypen betrug $10,1 \pm 0,6$ $\mu\text{M/mg Protein}$ und bei den P2Y₁-R-defizienten Mäusen $14,4 \pm 4,7$ $\mu\text{M/mg Protein}$. Die gemessenen Unterschiede im NO und Nitritgehalt in den Hirnhomogenaten von WT- und P2Y₁-R-defizienten Mäusen waren jedoch statistisch nicht signifikant.

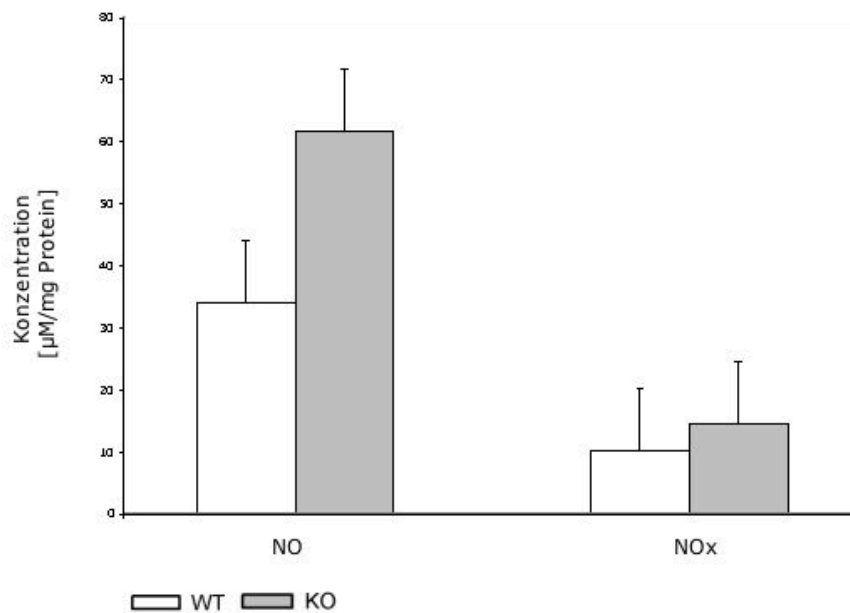


Abb. 13: Vergleich der in Hirnhomogenaten von Wildtyp (WT)- (weiße Säulen) und P2Y₁-R- (KO) defizienten Mäusen (graue Säulen) ermittelten Konzentration an NO und NOx (Nitrit). Die gemessenen Unterschiede im NO und Nitritgehalt in den Hirnhomogenaten von WT- und P2Y₁-R-defizienten Mäusen waren statistisch nicht signifikant. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 5 Tieren pro Gruppe.

4.3 Expression des Amyloidvorläuferproteins (APP)

Um zu prüfen, ob P2Y₁-R die Expression des APP beeinflussen, wurde Hirnmaterial von WT- und P2Y₁-R-defizienten Mäusen in eine membranäre und eine zytosolische Fraktion mittels Ultrazentrifugation getrennt und durch semiquantitativer Westernblot-Analyse die Expression des APP-Gehalt zwischen den Tiergruppen verglichen.

Die Banden für die APP-Expression wurden densitometrisch ausgewertet und auf den entsprechenden β -Aktiningehalt der Probe als interne Referenz normalisiert. Der Vergleich der relativen APP-Expression zur Kontrolle (Wildtyp = 100%,) in der Membran-(mAPP) und zytosolischen Fraktion (sAPP) aus Hirnmaterial von WT- und P2Y₁-R-defizienten Mäusen ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 15).

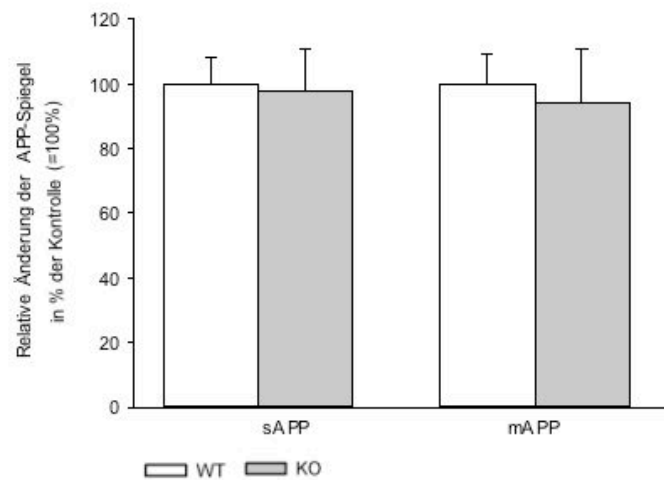


Abb.14: Vergleich der APP-Expression in der membranären (mAPP) und zytosolischen Fraktion (sAPP) aus Hirngewebe von WT- (weiße Säulen) und P2Y₁-R-(KO) defizienten Mäusen (graue Säulen). Der Vergleich der relativen APP-Expression zur Kontrolle (Wildtyp = 100%,) in der membranären (mAPP) und zytosolischen Fraktion (sAPP) aus Hirnmaterial von WT- und P2Y₁-R-defizienten Mäusen ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 3-4 Tieren pro Gruppe und sind dargestellt als %-Veränderung der APP-Expression zur Kontrolle (WT=100%).

5 Diskussion

In vorliegender Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Abwesenheit von P2Y₁-R die cholinerge, GABAerge und glutamaterge Transmission beeinflusst. Hierfür wurden P2Y₁-R-defiziente Mäuse im Alter von 3-4 Monaten einem Screening nach repräsentativen Markern der genannten Transmissionssysteme unterzogen. So konnten in Hirnen P2Y₁-R-defizienter Mäuse reduzierte AChE-Aktivitäten im Nc. arcuatus und Substantia nigra sowie Veränderungen in den Bindungsspiegeln der mAChR im ventromedialen Hypothalamus beobachtet werden, während die nAChR kaum beeinflusst waren. Weiter wurden im cingulären Kortex, Nc. accumbens, Hippocampus, ventromedialer und lateraler Hypothalamus sowie im auditorischen und visuellen Kortex von P2Y₁-R-defizienten Mäusen erhöhte GABA_A-Rezeptorbindungen im Vergleich zu WT-Mäusen gemessen, während kein Einfluss der P2Y₁-R-Defizienz auf NMDA-Rezeptoren gefunden wurde. In P2Y₁-R-defizienten Mäusen konnten keine Anzeichen von oxidativem Stress oder veränderter APP-Expression beobachtet werden.

5.1 Zentrale cholinerge Transmission bei P2Y₁-R-defizienten Mäusen

5.1.1 AChE

Um zu prüfen, ob das Fehlen von P2Y₁-Rezeptoren die regionale Verteilung der AChE beeinflusst, wurde die AChE histochemisch an Hirnschnitten nachgewiesen. Die in dieser Arbeit beobachtete histochemische Darstellung der AChE an Hirnschnitten von Wildtyp-Mäusen entsprach der schon früher von anderen Autoren beobachteten AChE-Histochemie (Höhmnn und Ebner 1985, Kristt et al. 1985, Olschowka und Vijayan 1980).

Die densitometrisch, mit Hilfe der Bildanalyse, ausgewerteten AChE-Präparate der P2Y₁-R-defizienten Mäuse ergaben, dass nur im Nc. arcuatus und Substantia nigra signifikante Unterschiede im Markierungsverhalten der AChE im Vergleich zu WT-Kontrollen beobachtet werden konnten. In den übrigen untersuchten Hirnregionen ließen sich keine Unterschiede in der AChE-Markierung zwischen P2Y₁-R-defizienten und WT-Mäusen feststellen.

Eine Zunahme der AChE könnte unter anderem auf eine verstärkte cholinerge Innervation hinweisen. Tatsächlich konnte an primären Neuronenkulturen gezeigt werden, dass die AChE-Promoter-Aktivität auch über P2Y₁-R reguliert wird (Siow et al. 2005). Es bleibt allerdings die Frage, warum die P2Y₁-R-abhängigen Veränderungen nur im Nc. arcuatus und Substantia nigra beobachtet wurden. Ein möglicher Zusammenhang ist denkbar: ATP

moduliert als physiologischer Ligand an P2-R die Aktivierung dopaminerger Neurone in der Substantia nigra (Choi et al. 2009), die wiederum unter gleichzeitiger Kontrolle cholinergischer Neurone in den pedunculo-pontinen tegmentalen Nuclei stehen (Lester et al. 2010). Informationen zur Innervation und Projektionen des an der Nahrungsaufnahme und der Gewichtsregulation beteiligten Nc. arcuatus sind rar. Die einzigen Hinweise, die zum Nachweis der AChE im Nc. arcuatus vorliegen, beziehen sich auf Walaas und Fonnum (1978). P2Y₁-R wurden durch Seidel et al. (2006) in dieser Region immunhistochemisch auf Astrozyten (Ko-Lokalisation mit GFAP) als auch auf Neuronen (Ko-Lokalisation mit nNOS) nachgewiesen.

Der histochemische Nachweis der AChE erlaubt den qualitativen und semiquantitativen Nachweis einer Beeinflussung von cholinergischen Targetregionen, während die Messung der Enzymaktivität quantitative Aussagen erlaubt. Der Vergleich der AChE-Aktivitäten in Hirnhomogenaten von P2Y₁-R-defizienten und WT-Mäusen ergab keinen signifikanten Unterschied in den Enzymaktivitäten, was wohl auf Grund des Verdünnungseffektes auch nicht erwartet werden kann.

5.1.2 ChAT

Die ChAT ist das Schlüssel-Enzym für die Acetylcholin-Synthese und wird als ein verlässlicher Marker für die Integrität des cholinergen Signalwegs herangezogen (Contestabile et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde die radiochemisch ermittelte Enzymaktivität in Hirnhomogenaten von P2Y₁-R-defizienten mit der Enzymaktivität von WT-Mäusen verglichen. Es konnten keine P2Y₁-R abhängigen Effekte auf die ChAT-Aktivität beobachtet werden. Ein immunhistochemischer Nachweis der Verteilung der ChAT an ausgewählten Hirnschnitten von P2Y₁-R-defizienten und WT-Mäusen könnte hier mehr Aufschluss geben.

Aus den vorliegenden Daten kann nicht auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Funktionalität von P2Y₁-R und der Synthese von Acetylcholin geschlossen werden. Allerdings bleibt zu berücksichtigen, dass mögliche kompensatorische Mechanismen einen solchen maskieren können (z.B. Verdünnungseffekt) oder aber, dass die Folgen der P2Y₁-R-Defizienz erst in höherem Lebensalter und/oder unter besonderen physiologischen Anforderungen relevant werden.

5.1.3 Acetylcholinrezeptoren in P2Y₁-R-defizienten Mäusen

In dieser Arbeit wurden die Bindungsspiegel der muskarinischen M₁-mAChR und der nikotinischen nAChR an Hirnschnitten von P2Y₁-R-defizienten und WT-Mäusen mittels quantitativer Autoradiographie erfasst.

a) M₁-mAChR

Die Analyse der Rezeptorautoradiographie M₁-muskarinischer Rezeptoren mit [³H]-Pirenzepin, einem muskarinischen AChR-Antagonist, zeigte im ventromedialen Hypothalamus eine um 57% signifikant niedrigere Rezeptordichte in den P2Y₁-R-defizienten Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen. In den übrigen analysierten Regionen war die Rezeptordichte nicht unterschiedlich.

Rezeptoren haben die Eigenschaft auf verändertes synaptisches Transmitterangebot mit Auf- oder Abregulation zu reagieren (sog. Rezeptorsuper- oder subsensitivität). Eine Auf (Up)-Regulation könnte Folge eines Mangels im synaptischen Spalt sein. Ursächlich für eine Ab (Down)-Regulation könnte zum einen ein erhöhtes ACh-Angebot im synaptischen Spalt, oder zum anderen der Verlust an Rezeptorprotein aufgrund von Zell- oder Faser-Verlust (Degeneration) sein. Die Rezeptorsensitivitätsänderungen können aber auch auf eine Änderung der Rezeptoraffinität zurückzuführen sein. Hierfür müssten Rezeptor-kinetische Untersuchungen (Radioligandbindungsstudien) durchgeführt werden.

Folglich könnte die im ventromedialen Hypothalamus beobachtete, erniedrigte Rezeptordichte auf eine Hyperaktivität der cholinergen Transmission (erhöhtes ACh-Angebot im synaptischen Spalt) oder auf den Verlust von Rezeptoren aufgrund degenerativer Prozesse zurückzuführen sein. Eine Klärung muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Allerdings gibt es eine Reihe von Befunden, die auf eine besondere Rolle von P2Y₁-R im Hypothalamus hinweisen. Exemplarisch für P2Y₁-R-abhängige physiologische Veränderungen in der hypothalamischen Region sei unter anderem erwähnt, dass nach Stimulation hypothalamischer P2Y₁-R in Ratten die Nahrungsaufnahme zunimmt (Kittner et al. 2006) während unter Nahrungsdeprivation die mRNA der P2Y₁-R im Hypothalamus reduziert ist (Seidel et al. 2006). P2Y₁-R-defiziente Mäuse weisen eine leicht erhöhte Nahrungsaufnahme gegenüber ihren Wildtypen auf (Drendel, Dissertation 2011). Sergeeva et al. (2006) zeigten eine P2Y₁-R vermittelte Erregung von TMN (tubero-mamillärer Nucleus) Neuronen in hypothalamischen Schnitten und Kulturen.

b) nAChR

Die nikotinischen ACh-R gehören zur Familie der liganden-gesteuerten Kationen-Kanäle und vermitteln die schnelle erregende Wirkung von ACh an der motorischen Endplatte bzw. in zentralnervösen Neuronen durch Öffnung von Kationenkanälen für Na^+ und K^+ (Burgis et al. 2000). Im Gehirn gibt es zwei wichtige nikotinische ACh-Rezeptoren: Zum einen den $\alpha 4\beta 2$ -Subtyp mit seinem spezifischen Agonisten Nikotin, der hauptsächlich in kortikalen Regionen zu finden ist und zum anderen den $\alpha 7$ -Subtyp, der α -Bungarotoxin mit hoher Affinität bindet und vorwiegend im Hippocampus vorkommt (Review von Zhang 2004, Sparks et al. 1998, Kawai et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis der nikotinischen ACh-R unter der Verwendung des Radioliganden [^3H]-Epibatidin, der vorwiegend den $\alpha 4\beta 2$ -Subtyp nachweist.

In den vorgelegten Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Ligandbindung des nACh-R zwischen WT und P2Y_1 -R-defizienten Mäusen gefunden werden. Auch wenn Literaturhinweise für eine direkte Interaktion von P2Y_1 -R mit dem nACh-R nicht existieren, könnte eine Dopamin-Freisetzung, die sowohl durch den nACh-R als auch den P2Y_1 -R moduliert wird, in den defizienten Mäusen verändert sein (Tani et al. 1997; Fischer und Krügel 2007). Dies bleibt zu prüfen.

5.2 GABA-Rezeptoren bei P2Y_1 -R-defizienten Mäusen

Ein wesentlicher Teil der inhibitorischen Neurotransmission wird über das GABAerge Transmittersystem gesteuert. GABA ist der bedeutendste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS, der vorwiegend in Interneuronen aber auch in Projektionsneuronen vorkommt. GABA vermittelt seine inhibitorischen Wirkungen über zwei pharmakologisch unterschiedliche Rezeptortypen: GABA_A - und GABA_B -Rezeptor. Als GABA_A -R werden heterooligomere Cl^- -Kanäle bezeichnet, an denen z.B. Muscimol als selektiver Agonist wirkt. Benzodiazepine und Barbiturate modulieren den GABA_A -R allosterisch an separaten Bindungsstellen (Haefely 1989).

Der GABA_B -Rezeptor gehört in die Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

In dieser Arbeit wurde zur Erfassung der Verteilung des GABA_A -R mittels Autoradiographie der Ligand [^3H]-Muscimol herangezogen. Beim Vergleich der [^3H]-Muscimol-Bindung zwischen den Wildtyp- und P2Y_1 -R-defizienten Mäusen zeigten sich erhebliche Unterschiede

zwischen den beiden Mauslinien. In der Mehrzahl der untersuchten Regionen war die Ligandbindung in den P2Y₁-R-defizienten Mäusen deutlich höher.

Ein signifikanter Unterschied in der Rezeptordichte der P2Y₁-R-defizienten Mäuse gegenüber den WT-Mäusen wurde in den folgenden Regionen gefunden: cingulärer Kortex, Nc. accumbens, Hippocampus, ventromedialer- und lateraler Hypothalamus sowie auditorischer und visueller Kortex. Die erhöhte Expression des Rezeptorproteins in P2Y₁-R-defizienten Mäuse spricht für einen erhöhten Bedarf an GABAerger Hemmung in den genannten Regionen.

Hierfür sprechen andere Studien, in denen motivationsbezogene Verhaltensänderungen der P2Y₁-R-defizienten Mäuse gefunden werden (Drendel, 2011). Von erheblichem Interesse ist dabei, dass die accumbalen GABAergen „medium size spiny“ Projektionsneurone, der maßgebliche Zellanteil (90-95%) in dieser Region, einer strengen P2Y₁-R-vermittelten Regulation unterliegen (Krügel et al. 2001, 2003). Diese Neuronen bilden Subpopulationen sogenannter „direkter“ und „indirekter“ Pathways, die einerseits das Mittelhirn (SN/VTA) direkt im Sinne eines Feedback inhibieren. Andererseits bewirkt eine Hemmung dieser Neurone eine funktionelle Aktivierung des indirekten Pathways durch einen verminderten GABAergen und enkephalineren Input in das ventrale Pallidum, das normalerweise solche subthalamische Zellen hemmt, die die inhibitorischen Eingänge in den Thalamus aktivieren (Surmeier et al. 2007). Durch diese multiplen Verschaltungen führt die Inhibition des indirekten Signalwegs auf der Ebene des Nc. accumbens letztlich zur Aktivierung des Thalamus (Kelley 2004; Gerfen et al. 1990; Surmeier et al. 2007). Damit könnten das Fehlen der P2Y₁-R, die erhöhte GABA_A-R-Expression und die beobachteten Verhaltensunterschiede in einem kausalen Zusammenhang stehen.

Letztlich ist nur sehr wenig über die Funktion von P2Y-R an inhibitorischen Synapsen bekannt. Saitow et al. (2005) konnten zeigen, dass cerebellare P2Y-R die GABAerge Transmission in verschiedenen räumlichen und zeitlichen Domänen, Kurzzeit- und Langzeit-Plastizität, durch prä- und postsynaptische Mechanismen, an Interneuron/Purkinjezell-Synapsen modulieren und damit den Informationsfluss innerhalb des cerebellaren Cortex steuern.

5.3 NMDA-Rezeptoren in P2Y₁-R-defizienten Mäusen

Das glutamaterge System ist in Vorgänge, wie die schnelle synaptische Übertragung, neuronale Plastizität, Langzeitpotenzierung im Hippocampus, Gedächtnis, Lernen, Verhalten,

neuroendokrine Regulation sowie in extrapyramidal motorische Regulation einbezogen. Es ist in die Ätiopathogenese verschiedener neuropsychiatrischer Erkrankungen, wie AD, Morbus Parkinson, Epilepsie, Schizophrenie und Depression durch Exzitotoxizität (Cacabelos et al. 1999, Olney et al. 1997) involviert. L-Glutamat ist der wichtigste erregende Transmitter des ZNS. Man unterscheidet zwei Hauptgruppen von Glutamatrezeptoren: Zum einen ionotrope Rezeptoren, die pentamere Kationenkanäle (Ca^{2+}) repräsentieren zum anderen metabotrope Rezeptoren, die mit G-Proteinen gekoppelt sind. Zu den ionotropen Rezeptoren gehören der NMDA-R, der AMPA-R und der Kainatrezeptor.

Diese Arbeit beschränkte sich auf das Screening von P2Y_1 -R-vermittelten Änderungen der NMDA-Rezeptor-Spiegel an Hirnschnitten von P2Y_1 -R-defizienten Mäusen. Hierfür wurde die quantitative Rezeptorautoradiographie unter Verwendung des Radioliganden [^3H]-MK-801, ein Antagonist des NMDA-R, herangezogen. Das an Hirnschnitten von WT-Mäusen beobachtete Verteilungsmuster der NMDA-Rezeptoren entsprach der Verteilung, die auch in früheren autoradiographischen Studien beschrieben wurde (Wenk et al. 1991; Martens et al. 1998).

Beim Vergleich der NMDA-R-Verteilungsmuster in Hirnen von P2Y_1 -R-defizienten Mäusen mit denen von WT-Mäusen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der NMDA-Rezeptordichte in den analysierten Regionen. Das spricht dafür, dass glutamaterge Mechanismen keiner direkten Kontrolle durch P2Y_1 -R unterliegen.

5.4 Oxidativer Stress in P2Y_1 -R-defizienten Mäusen

Zelluläres Überleben ist ein kritischer Punkt im Beginn und Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen und nach pathologischen Ereignissen, wie Ischämie und traumatischer Hirnverletzung. Oxidativer Stress kann den Zelltod unter solchen pathologischen Bedingungen induzieren. Zusätzlich zu den Wirkungen im Sinne eines schnellen Neurotransmitters, unter normalen physiologischen Bedingungen, übt ATP auch neurotrophe Funktionen aus, indem es zelluläre Antworten auf verschiedene neurotoxische Stimuli vermittelt. Extrazelluläres ATP stimuliert die Synthese und Freisetzung von trophischen Faktoren aus Astrozyten, die die Differenzierung, Neuritenwachstum, Neurogenese und Neuritenregeneration beeinflussen (Neary et al. 2003; Rathbone et al. 1999; Heine et al. 2006; Lin et al. 2007). Über P2-R kann ATP die präsynaptische Freisetzung von GABA im Hippokampus stimulieren und damit, z.B. protektiv gegenüber den zytotoxischen Wirkungen erhöhter Glutamatfreisetzung wirken (Inoue et al. 1999). Auch eine beschleunigte Wiederherstellung hypoxischer/hypoglykämischer Störungen der hippokampalen

Transmission durch ATP wurde gezeigt (Aihara et al. 2002). Dabei scheint die Funktionalität der Astrozyten für das Überleben der Neuronen eine wichtige Rolle zu spielen (Giffard and Swanson 2005; Takuma et al. 2004). P2Y₁-R auf Astrozyten in Kulturen des Vorderhirns von Ratten sind offenbar an dem Schutz vor zytotoxischen Wirkungen von Wasserstoffperoxid (H₂O₂), einer der wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die besonders unter pathologischen Bedingungen entstehen, beteiligt (Shinozaki et al. 2005). Es kann deshalb vermutet werden, dass P2Y₁-R auch *in vivo* eine entscheidende Rolle bei der astrozytenvermittelten Protektion von Neuronen vor oxidativem Stress spielen.

Hinweise auf physiologische Interaktionen von P2Y₁-R und NO lieferten Kittner et al. (2003). Die zeigten konnten, dass die Stimulation von zentralen P2Y₁-R eine anxiogene Wirkung erzeugt, die durch den NOS Inhibitor N-Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME) antagonisiert werden konnte. Ähnliche Befunde ergaben sich bei der Untersuchung der ATP-vermittelten Nahrungsaufnahme bzw. bei Nahrungsrestriktion (Kittner et al. 2006, Seidel et al. 2006). Für eine enge Interaktion von nNOS und P2Y₁-R spricht auch die, in diesen Studien gezeigte, Ko-Lokalisation beider Proteine durch Doppelimmunofluoreszenz.

Um diese Befunde weiter abzuklären, sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob P2Y₁-R-Defizienz den oxidativen Status im Hirn verändert. Hierfür wurden zwei Marker für oxidativen Stress herangezogen: die Bestimmung der Aktivität der Glutathionperoxidase (GPx), ein wichtiges Enzym im „anti-oxidativen Verteidigungssystems“ des Hirns, und die Erfassung von reaktiven Stickstoff-Spezies (NO, Nitrit) im Hirnhomogenat mittels der Griess-Reaktion.

Beim Vergleich der GPx-Aktivitäten und der Spiegel an reaktiven Stickstoff-Spezies in Hirnhomogenaten von WT- und P2Y₁-R-defizienten Mäusen konnten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Tierspezies in den studierten Parametern beobachtet werden. Das könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass der P2Y₁-R den oxidativen Stress nicht beeinflusst, zum anderen könnten Kompensationsmechanismen vorliegen, die P2Y₁-induzierte Effekte ausgleichen. Allerdings sollten auch altersabhängige Einflüsse in Betracht gezogen werden, denn es wurden nur Tiere im Alter von 3-4 Monaten untersucht.

Weiterhin muss angemerkt werden, dass die Messungen im Gesamthomogenat nicht geeignet sind, regionale Unterschiede zu erfassen. Dies sollte weiteren Untersuchungen vorbehalten sein.

5.5 APP-Expression in P2Y₁-R-defizienten Mäusen

Das Amyloidvorläuferprotein (Amyloid Precursor Protein, APP) gehört zur Familie glykosilierter Transmembranproteine, die ubiquitär im Gehirn exprimiert werden. Das APP kann auf zwei Wegen prozessiert werden. Beim nicht-amyloidogenen physiologischen Abbauweg wird das APP durch die stufenweise Wirkung von zwei Proteasen, die α - und die γ -Sekretase, in sAPP α , in das lösliche Peptid p3, und in das in der Membran zurückbleibende C-terminale Fragment gespalten. Beim amyloidogenen Weg erfolgt die Spaltung des APP in sAPP β , β -Amyloid und ein C-terminales Fragment durch die katalytische Wirkung der β - und γ -Sekretase (Selkoe et al. 1996).

Die physiologische Funktion von APP ist immer noch weitgehend unklar, während für sAPP α neurotrophe Wirkungen beschrieben wurden (Hoe et al. 2010).

Die Untersuchung des Einflusses des trophischen Faktors ATP auf die Synthese und Prozessierung von APP steht erst am Anfang. Kürzlich wurde beschrieben, dass ATP die APP Produktion und Freisetzung in corticalen Neuronen stimuliert. Offensichtlich sind unter Zellkulturbedingungen P2Y₂-R und P2Y₄-R über einen MAPK-abhängigen Prozess beteiligt (Tran 2011).

Um zu prüfen, ob ein Verlust an P2Y₁-R die APP-Expression beeinflussen kann, wurden in vorliegender Arbeit die APP-Spiegel mittels WesternBlot-Analyse in Hirnmaterial von P2Y₁-R-defizienten Mäusen mit denen von WT-Mäusen verglichen. Es wurde zwischen membran-gebundenem (mAPP) und löslichem (zytosolischem) sAPP differenziert. Es wird angenommen, dass die zytosolische Fraktion hauptsächlich das prozessierte APP (sAPP α , sAPP β) enthält, während das APP in der Membranfraktion das „full length“, nicht prozessierte APP repräsentiert.

Die semiquantitative densitometrische Auswertung der Immunoblots für APP ergab, dass P2Y₁-Defizienz keinen Einfluss auf die APP-Prozessierung zu haben scheint. Allerdings muss einschränkend bemerkt werden, dass sich die Befunde auf das Gesamthirn beziehen, also keine Regionen-spezifische Untersuchungen vorliegen. Darüber hinaus sollten in zukünftigen Untersuchungen auch altersabhängige Einflüsse berücksichtigt werden.

5.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten wurden für das frühe adulte Lebensalter beider Mauslinien ermittelt. Es ist möglich, dass die purinerge Modulation von Transmissionsvorgängen und von trophischen Mechanismen über P2Y₁-R erst in höherem

Lebensalter eine kritische Rolle spielt. Es ist möglich, dass das Fehlen des P2Y₁-R komplett oder teilweise durch bis heute unbekannte Mechanismen kompensiert wird.

Die vergleichsweise geringen Unterschiede im cholinergen System im frühen adulten Lebensalter könnten Ausgangspunkt einer progredienten Vulnerabilität dieses Systems im höheren Lebensalter oder unter den pathophysiologischen Bedingungen zerebraler Erkrankungen sein. Auch fehlende Differenzen bei Markern für oxidativen Stress zum gewählten Untersuchungszeitpunkt schließen spätere Veränderungen nicht aus. Da Untersuchungen zur Bedeutung von P2Y₁-R bei altersbedingten zentralnervalen Veränderungen oder im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen noch nicht vorliegen, sollte diese Problematik Gegenstand weiterer Forschung sein.

Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchungen, die präferenzielle Erhöhung der GABA_A-Rezeptorbindung in mesolimbischen Hirnregionen der P2Y₁-R-defizienten Mäuse steht im Einklang mit Verhaltensbefunden, die zeigen, dass diese Rezeptoren bei der Vermittlung appetitiver und aversiver Reaktionen eine wichtige Rolle spielen. Sie sind damit ein interessantes Target für die Entwicklung von neuen Therapiestrategien, z.B. zur Behandlung psychomotorischer Erkrankungen oder Ernährungsstörungen.

6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Charakterisierung der P2Y₁-Rezeptor-defizienten Maus

Untersuchungen der cholinergen, GABAergen und glutamatergen Neurotransmission

eingereicht von

Laura Anna Vogt

angefertigt am

Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie und am
Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung

der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. habil. Reinhard Schliebs

Dr. rer. nat. Ute Krügel

Juni 2011

Die Identifizierung von ATP als Ko-Transmitter im sympathischen, parasympathischen und im Zentralnervensystem in den frühen 1970iger Jahren war ein entscheidender Ausgangspunkt für intensive Forschungen, was letztlich zur Entdeckung der purinergen Neurotransmission im ZNS führte, d.h., der Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden durch Bindung von Purinen und Pyrimidinen an purinerge Rezeptoren.

Die Familie der purinergen Rezeptoren besteht aus den Adenosin-Rezeptoren (P1) und den ATP/Nukleotid-Rezeptoren (P2). Während die P2X-Rezeptoren als ligandgesteuerte Ionenkanäle schnelle Effekte vermitteln, tragen die P2Y-Rezeptoren, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören zur Vermittlung trophischer Effekte, wie Proliferation, Neurogenese, Zelldifferenzierung, aber auch zur Induktion von Apoptose bei. Insbesondere der Rezeptorsubtyp P2Y₁ scheint bei Entzündungsprozessen sowie bei De- und

Regenerationsmechanismen beteiligt zu sein, wofür allerdings bisher nur wenig Informationen aus in vivo bzw. ex vivo Studien vorliegen.

Da P2Y₁-Rezeptoren sowohl von Neuronen und Gliazellen exprimiert werden und im Zentralnervensystem ubiquitär vorkommen, können durch deren Aktivierung prä- und postsynaptische Effekte ausgelöst werden, wie z.B. die Modulation der Freisetzung von Neurotransmittern und der von ihnen vermittelten Antworten, die Neuron-Glia-Kommunikation und die Vermittlung von trophischen Prozessen.

Da die physiologische Funktion der P2Y₁-Rezeptoren, insbesondere das Zusammenspiel mit anderen Transmissionssystemen im zerebralen Kortex, noch weitgehend unklar ist, sollte in vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob die Abwesenheit von P2Y₁-Rezeptoren im Hirn die zentralnervöse cholinerge, GABAerge und glutamaterge Neurotransmission beeinflussen kann. Um die physiologische Bedeutung der P2Y₁-Rezeptoren für die Modulation dieser Transmissionssysteme in vivo zu untersuchen, stand eine genetisch veränderte Maus mit unterdrückter Expression des P2Y₁-Rezeptors (P2Y₁-Rezeptor-defiziente Maus) zur Verfügung, die bereits ausreichend in der Arbeitsgruppe charakterisiert war, und somit ein geeignetes in vivo Modell zur Klärung der genannten Fragestellung darstellt.

Für die vorgestellten Untersuchungen wurden P2Y₁-Rezeptor-defiziente Mäuse im Alter von 3-4 Monaten und altersgerechte nicht genetisch veränderte Tiere (Wildtyp) als Kontrollen herangezogen, die Hirne isoliert und entlang der Mittellinie sagittal in zwei Hälften geteilt. Während von der einen Hirnhälfte Serienschnitte für die histochemischen und Rezeptor-autoradiographischen Untersuchungen angefertigt wurden, stand die andere Hälfte als Homogenat für biochemische Analysen zur Verfügung: Bestimmung der Enzymaktivitäten der Cholinacetyltransferase, Acetylcholinesterase und Glutathionperoxidase, Bildung reaktiver Stickstoff-Spezies, Expression des Amyloidpräkursorproteins mittels Westernblotting. Die quantitative Auswertung der histochemischen Präparate und der Rezeptorautoradiogramme erfolgte durch eine PC-gestützte Bildanalyse und unter Anwendung der Software MCID 4.0.

An ausgewählten Hirnarealen aus P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäusen wurden die Bindungsspiegel cholinерger, GABAerger und glutamaterger Rezeptorsubtypen mittels

Radioligand-Bindung und quantitativer Rezeptorautoradiographie erfasst. So konnte im ventromedialen Hypothalamus aus P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäusen eine signifikant verminderte Bindung von [³H]-Pirenzipin an den M1-muskarinischen Acetylcholinrezeptor im Vergleich zu entsprechenden Messdaten an Hirnmaterial aus Wildtyptieren beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu waren die gemessenen Bindungsspiegel von [³H]-Epibatidin an nikotinische Acetylcholinrezeptoren des α2β3-Subtyps in keiner der untersuchten Hirnareale signifikant verschieden von den Daten, die in entsprechenden Hirnregionen aus Kontrollmäusen beobachtet wurden.

Die semiquantitative densitometrische Auswertung der Präparate der Acetylcholinesterase-Histochemie ergab signifikante Erhöhungen der Acetylcholinesterase-Markierungen in der Substantia nigra und im Nc. arcuatus von P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäusen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollwerten. Demgegenüber wurden bei der radiochemischen Bestimmung der Aktivität der Acetylcholinesterase und der Cholinacetyltransferase in den Hirnhomogenaten aus P2Y₁-Rezeptor-defizienten und Wildtyp-Mäusen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien festgestellt.

Die Bindung von [³H]-Muscimol an GABAA-Rezeptoren war in mesolimbischen Hirnregionen aus P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäusen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollwerten signifikant erhöht, während die gemessenen Bindungsspiegel von [³H]-MK-801 an NMDA-Rezeptoren in den untersuchten Hirnregionen kaum beeinflusst waren.

Das Auftreten von oxidativem Stress wurde durch Erfassung der Aktivität der Glutathionperoxidase und durch Abschätzung des Auftretens von reaktiven Stickstoffspezies erfasst. Die Untersuchung der Hirnhomogenate aus P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäusen und nicht genetisch veränderten Wildtyp-Mäusen ergab keine Hinweise auf genetisch bedingte Unterschiede in der Aktivität der Glutathionperoxidase und in den Konzentrationen an NO und NOx zwischen den beiden Mauslinien.

Weiterhin wurde mittels semiquantitativer Western-Analyse der Frage nachgegangen, ob die Abwesenheit von P2Y₁-R die Expression des Amyloidpräkursorproteins (APP) beeinflusst. Die densitometrische Auswertung der Westernblots, zum Nachweis von APP, ergab keine Hinweise auf eine durch P2Y₁-Rezeptor-Defizienz-bedingte Veränderung in der zellulären Expression von APP im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen.

Die hier vorgestellten Untersuchungen an einem in vivo-Modell zeigen erstmals, dass P2Y₁-Rezeptor-Defizienz synaptische Prozesse der cholinergen und der GABAergen Neurotransmission regionenspezifisch beeinflussen kann. Insbesondere die Erhöhung der GABA_A-Rezeptorbindung in mesolimbischen Hirnregionen der P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäuse steht im Einklang mit Verhaltensbefunden, die zeigen, dass diese Rezeptoren bei der Vermittlung appetitiver und aversiver Reaktionen eine wichtige Rolle spielen. Sie sind damit ein interessantes Target für die Entwicklung von neuen Therapiestrategien, z.B. zur Behandlung psychomotorischer Erkrankungen oder Ernährungsstörungen.

Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A. und Zimmermann, H. (2009): Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* **32**, 19-29.
- Abbracchio, M.P., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M.T., King, B.F., Gachet, C., Jacobsen, K.A., Weisman, G.A. und Burnstock, G. (2003): Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 52.
- Agresti, C., Meomartini, M.E., Amadio, S., Ambrosini, E., Serafini, B., Franchini, L., Volonte, C., Aloisi, F. und Visentin, S. (2005): Metabotropic P2 receptor activation regulates oligodendrocytes progenitor migration and development. *Glia.* **50**, 132.
- Aihara, H., Fujiwara, S., Mizuta, I., Tada, H., Kanno, T., Tozaki, H., Nagai, K., Yajima, Y., Inoue, K., Kondoh, T., Motooka, Y. und Nishizaki, T. (2002): Adenosine triphosphate accelerates recovery from hypoxic/hypoglycemic perturbation of guinea pig hippocampal neurotransmission via a P2 receptor. *Brain Res.* **11**, 31-37.
- Andrä, J. und Lojda, Z. (1986): A histochemical method for the demonstration of acetylcholinesterase activity using semipermeable membranes. *Histochemistry.* **84**, 575-579.
- Arendt, T. und Bigl, V. (1986): Alzheimer plaques and cortical cholinergic innervation. *Neuroscience.* **17**, 277-279.
- Arendt, T., Bigl, V., Arendt, A. und Tennstedt, A. (1983): Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol.* **61**, 101-108.
- Arthur, D.B., Akassoglou, K., und Insel, P.A. (2005): P2Y₂ receptor activates nerve growth factor/TrkA signalling to enhance neuronal differentiation. *Proc Natl Sci USA.* **102**, 19138-19143.
- Barbelivien, A., Bertrand, N., Besret, L., Beley, A., MacKenzie, E.T. und Dauphin, F. (1999): Neurochemical stimulation of the rat substantia innominata increases cerebral blood flow (but no glucose use) through the parallel activation of cholinergic and non-cholinergic pathways. *Brain Res.* **840**, 115-124.
- Barnard, E.A., Burnstock, G. und Webb, T.E. (1994): G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* **15**, 67.

- Bennett, G.C, Ford, A.P, Smith, J.A., Emmett, C.J., Webb, T.E. und Boarder, M.R. (2003): P2Y receptor regulation of cultured rat cerebral cortical cells: calcium responses and mRNA expression in neurons and glia. *Br J Pharmacol.* **139**, 279.
- Bianco, F., Fumagalli, M., Pravettoni, E., D'Ambrosi, N., Volonte, C., Matteoli, M., Abbracchio, M.P. und Verderio, C. (2005): Pathophysiological roles of nucleotides in glia cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia. *Brain Res Brain Res Rev.* **48**, 144.
- Biesold, D., Inanami, O., Sato, A. und Sato, Y. (1989): Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases cerebral cortical blood flow in rats. *Neurosci Lett.* **98**, 39-44.
- Bigl, V. und Schliebs, R. (1998): Stimulation of cholinergic deficits – a novel experimental approach to study pathogenetic aspects of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl.* **53**, 237-247.
- Bigl, V., Arendt, T. und Biesold, D. (1990): The nucleus basalis of Meynert during aging and in dementing neuropsychiatric disorders. In: Steriade M., Biesold, D. (eds) Brain cholinergic systems. *Oxford University Press*, Oxford **364-386**.
- Bolego, C., Ceruti, S., Brambilla, R., Puglisi, L., Cattabeni, F., Burnstock, G. und Abbracchio, M.P. (1997): Characterization of the signalling pathways involved in ATP and basic fibroblast growth factor-induced astrogliosis. *Br J Pharmacol.* **121**, 1692.
- Brambilla, R., Neary, J.T., Cattabeni, F., Cottini, L., D'Ippolito, G., Schiller, P.C. und Abbracchio, M.P. (2002): Induction of COX-2 and reactive gliosis by P2Y receptors in rat cortical astrocytes is dependent on ERK1/2 but independent of calcium signalling. *J Neurochem.* **83**, 1285.
- Brinson, A.E. und Harden, T.K. (2001): Differential regulation of the uridine nucleotide-activated P2Y₄ and P2Y₆ receptors. SER-333 and SER-334 in the carboxyl terminus are involved in agonist-dependent phosphorylation desensitization and internalization of the P2Y₄ receptor. *J Biol Chem.* **276**, 11939.
- Burnstock, G. (2007): Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* **87**, 659-797.
- Burnstock, G. (2003): Purinergic receptors in the nervous system. In: Current Topics in Membranes Purinergic Receptors and Signalling. *Academ Press.* **54**, 307-368.
- Burnstock, G. (2004): Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem.* **4**, 793.
- Burnstock, G. und Knight, G.E. (2004): Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* **240**, 31.
- Burnstock, G. (2006): Historical review: ATP as neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci.* **27**, 166.
- Burnstock, G. (2008): Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* **7**, 576.

- Butcher, L.L. und Woolf, N.J. (2004): Cholinergic neurons and networks revisited. In: Paxinos G, editor. The rat central nervous system. 3rd ed. San Diego: Academic Press 1257-1268.
- Cacabelos, R., Takeda, M. und Winblad, B. (1999): The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. **14**, 3- 47.
- Chessell, I.P., Hatcher, J.P., Bountra, C., Michel, A.D., Hughes, J.P., Green, P., Egerton, J., Murfin, M., Richardson, J., Peck, W.L., Grahames, C.P., Casula, M.A., Yiangou, Y., Birch, R., Anand, P. und Buell, G.N. (2005): Disruption of the P2X7 Purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain*. **114**, 386-396.
- Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A. und Junger, W.G. (2006): ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y₂ and A3 receptors. *Science*. **314**, 1792-1795.
- Cheung, K.K., Ryten, M. und Burnstock, G. (2003): Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development. *Dev Dyn*. **228**, 254.
- Choi, Y.M., Jang, J.Y., Jang, M., Kim, S.H., Kang, Y.K., Cho, H., Chung, S. und Park, M.K. (2009): Modulation of firing activity by ATP in dopamine neurons of the rat substantia nigra pars compacta. *Neuroscience*. **160**, 587-95.
- Contestabile, A., Ciani, E. und Contestabile, A. (2008): The place of choline acetyltransferase activity measurement in the "Cholinergic Hypothesis" of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*. **33**, 318-327.
- Cotrina, M.L., Lin, J.H., López-García, J.C., Naus, C.C. und Nedergaard, M. (2000): ATP-mediated glia signalling. *J Neurosci*. **20**, 2835-44.
- Cressman, V.L., Lazarowski, E., Homolya, L., Boucher, R.C., Koller, B.H. und Grubb, B.R. (1999): Effect loss of P2Y₂ receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl⁻ transport. *J Biol Chem*. **274**, 26461-26468.
- Cunha, R.A. und Ribeiro, J.A. (2000): ATP a presynaptic ionotropic receptor and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci*. **24**, 592-597.
- Dale, N. (2008): Dynamic ATP signalling and neural development. *J Physiol*. **586**, 2429-2436.
- D'Ambrosi, N., Murra, B., Cavaliere, F., Amadio, S., Bernardi, G., Burnstock, G. und Volonte, C. (2001): Interaction between ATP and nerve growth factor signalling in the survival and neuritic outgrowth from PC12 cells. *Neuroscience*. **108**, 527.
- Detari, L., Ramusson, D.D. und Semba, K. (1999): The role of basal forebrain neurons in tonic and phasic activation of the cerebral cortex. *Prog Neurobiol*. **58**, 249-277.

- Ding, Z., Tuluc, F., Bandivadekar, K.R., Zhang, L., Jin, J. und Kunapuli, S.P. (2005): Arg333 and Arg334 in the COOH terminus of the human P2Y₁ receptor are crucial for Gq coupling. *Am J Physiol Cell Physiol.* **288**, C559.
- Dranoff, J.A., O'Neill, A.F., Franco, A.M., Cai, S.Y., Connolly, G.C., Ballatori, N., Boyer und J.L. und Nathanson, M.H. (2000): A primitive ATP receptor from the little skate *Raja erinacea*. *J Biol Chem.* **275**, 30701.
- Drendel, V. Phänotypisierung von P2Y-Rezeptor-Knockout-Mäusen (2011): Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig.
- Fellin, T., Sul, J.Y., D'Ascenzo, M., Takano, H., Pascual, O. und Haydon, P.G. (2006): Bidirectional astrocyte-neuron communication: the many roles of glutamate and ATP. *Novartis Found Symp.* **276**, 208-17.
- Fonnum, F. (1975): A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J Neurochem.* **24**, 407-9.
- Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G. und Kinnamon, S.C. (2005): ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science.* **310**, 1495-1499
- Fischer, W. und Krügel, U. (2007): P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr Med Chem.* **14**, 2429-55.
- Flores, R.V., Hernandez-Perez, M.G., Aquino, E., Garrad, R.C., Weisman, G.A. und Gonzalez, F.A. (2005): Agonist-induced phosphorylation and desensitization of the P2Y₂ nucleotide receptor. *Mol Cell Biochem.* **280**, 35.
- Franke, H., Sauer, C., Rudolph, C., Krügel, U., Hengstler, J.G. und Illes, P. (2009): P2 receptor-mediated stimulation of the PI3-K/Akt-pathway in vivo. *Glia.* **57**, 1031-45.
- Franke, H., Grummich, B., Härtig, W., Grosche, J., Regenthal, R., Edwards, R.H., Illes, P. und Krügel, U. (2006): Changes in purinergic signaling after cerebral injury – involvement of glutamatergic mechanisms? *Int J Dev Neurosci.* **24**, 123.
- Franke, H., Krügel, U., Grosche, J., Heine, C., Härtig, W., Allgaier, C. und Illes P. (2004): P2Y receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience.* **127**, 431.
- Franklin, K. B. J. und Paxinos, G. (2001): The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Academic press.*
- Frotscher, M. (1992): Specificity of interneuronal connections. *Ann Anat.* **174**, 377-382.
- Fumagalli, M., Brambilla, R., D'Ambrosi, N., Volonte, C., Matteoli, M., Verderio, C. und Abbracchio, M.P. (2003): Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia.* **43**, 218.

- Gachet, C. (2008): P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost.* **99**, 466-472.
- Gerevich, Z., Müller, C. und Illes, P. (2005): Metabotropic P2Y₁ receptors inhibit P2X₃ receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Europ J Pharmacol.* **521**, 34.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J. Jr. und Sibley, D.R. (1990): D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* **250**, 1429-32.
- Ghanem, E., Robaye, B., Leal, T., Leipziger, J., Van Driessche, W., Beauwens, R. und Boeynaems, J.M. (2005): The role of epithelial P2Y₂ and P2Y₄ receptors in the regulation of intestinal chloride secretion. *Br J Pharmacol.* **146**, 364-369.
- Giaroni, C., Knight, G.E., Ruan, H.Z., Glass, R., Bardini, M., Lecchini, S., Frigo, G. und Burnstock, G. (2002): P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology.* **43**, 1313-1323.
- Giffard, R.G. und Swanson, R.A. (2005): Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. *Glia.* **50**, 299-306.
- Goncalves, R.G., Gabrich, L., Rosario, A.Jr., Takiay, C.M., Ferriera, M.L., Chiarini, L.B., Persechini, P.M., Coutinho-Silva, R. and Leite, M. Jr. (2006): The role of purinergic P2X₇ receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice. *Kidney Int.* **70**, 1599-1606.
- Griess, J.P. (1879): Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt 'Ueber einige Azoverbindungen'. *Ber Deutsch Chem Ges.*, **12**, 426.
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C. und Kater, S.B. (1999): ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci.* **19**, 520-8.
- Guzman, S.J., Schmidt, H., Franke, H., Krügel, U., Eilers, J., Illes, P. und Gerevich, Z. (2010): P2Y₁ receptors inhibit long-term depression in the prefrontal cortex. *Neuropharmacology.* **59**, 406-4415.
- Haefely, W.E. (1989): Pharmacology of the benzodiazepine receptor. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci.* **238**, 294-301.
- Hawkins, K.I. und Knittle, C.E (1972): Comparison of acetylcholinesterase determination by the Michael and Ellman Methods. *Anal Chem.* **44**, 416-7.
- Hechler, B., Freund, M., Magnenat, S., Cazenave, J.P. und Gachet, C. (2008): Reduced atherosclerotic lesions in P2Y₁/apolipoprotein E double-knockout mice: the contribution of non-hematopoietic-derived P2Y₁ receptors. *Circulation.* **118**, 754-763.

- Heine, C., Heimrich, B., Vogt, J., Wegner, A., Illes, P. und Franke, H. (2006): P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro. *Neuroscience*. **138**, 303-11.
- Homolya, L., Watt, W.C., Lazarowski, E.R., Koller, B.H. und Boucher, R.C. (1999): Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y₂ receptor (-/-) mice. *J Biol Chem*. **274**, 26454-26460.
- Hoe, H.S., Lee, H.K. und Pak, D.T. (2010): The Upside of APP at Synapses. *CNS Neurosci Ther*. doi: 10.1111/j. 1755-5949.2010.00221.x.
- Höhmnn, C.F. und Ebner, F.F. (1985): Development of cholinergic markers in mouse forebrain. I. Choline acetyltransferase enzyme activity and acetylcholinesterase histochemistry. *Brain Res*. **355**, 225-41.
- Inscho, E.W., Cook, A.K., Imig, J.D., Vial, C. und Evans, R.J. (2003): Physiological role of P2X1 receptors in renal microvascular autoregulatory behavior. *J Clin Invest*. **112**, 1895-1905.
- Inoue, K., Koizumi, S., Ueno, S., Kita, A. und Tsuda, M. (1999): The functions of ATP receptors in the synaptic transmission in the hippocampus. *Prog Brain Res*. **120**, 193-206.
- Inoue, K., Koizumi, S. und Tsuda, M. (2007): The role of nucleotides in the neuron-glia communication responsible for the brain functions. *J Neurochem*. **102**, 1447-58.
- Johnson, C.D. und Russell, R.L. (1975): A rapid, simple radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations. *Anal Biochem*. **64**, 229-38.
- Kawai, H., Zago, W. und Berg, D.K. (2002): Nicotinic alpha 7 receptor clusters on hippocampal GABAergic neurons: regulation by synaptic activity and neurotrophins. *J Neurosci*. **22**, 7903-12.
- Kelley, A.E. (2004): Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev*. **27**, 765-76.
- Kittner, H., Franke, H., Harsch, J., El-Ashmawy, I.M., Seider, B., Krügel, U. und Illes, P. (2006): Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y₁ receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides. *Eur J Neurosci*. **24**, 2049-2056.
- Kittner, H., Franke, H., Fischer, W., Schultheis, N., Krügel, U. und Illes, P. (2003): Stimulation of P2Y₁ receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: Implications for the involvement of P2Y₁ receptor-mediated nitric oxide production. *Neuropsychopharmacology*. **28**, 435-444.
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Dai, Y., Obata, K., Tokunaga, A. und Noguchi, K. (2006): Neurons and glial cells differentially express P2Y receptor mRNAs in the rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J Comp Neurol*. **498**, 443.

- Kristt, D.A., McGowan, R.A. Jr., Martin-MacKinnon, N. und Solomon, J. (1985): Basal forebrain innervation of rodent neocortex: studies using acetylcholinesterase histochemistry, Golgi and lesion strategies. *Brain Res.* **337**, 19-39.
- Krügel, U., Spies, O., Regenthal, R., Illes, P. und Kittner, H. (2004): P2 receptors are involved in the mediation of motivation-related behavior. *Purinergic Signalling* **1**, 21-29.
- Krügel, U., Schraft, T., Kittner, H., Kiess, W. und Illes, P. (2003): Basal and feeding-evoked dopamine release in the rat accumbens is depressed by leptin. *Eur J Pharmacol.* **482**, 185-7.
- Krügel, U., Kittner, H. und Illes, P. (2001a): Mechanisms of adenosine 5'-triphosphate-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens in vivo. *Synapse.* **39**, 222.
- Krügel, U., Kittner, H., Franke, H. und Illes, P. (2001b): Stimulation of P2 receptors in the ventral tegmental area enhances dopaminergic mechanisms in vivo. *Neuropharmacology.* **40**, 1084-1093.
- Krügel, U., Kittner, H., Franke, H. und Illes, P. (2001c): Accelerated functional recovery after neuronal injury by P2 receptor blockade. *Eur J Pharmacol.* **420**, 3.
- Kügelgen von, I. und Wetter, A. (2000): Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **362**, 310.
- Kyriakis, J.M. und Avruch, J. (1996): Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem.* **271**, 24313.
- Labasi, J.M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M.M., Brisette, W., Wicks, J.R., Audoly, L. and Gabel, C.A. (2002): Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol.* **168**, 6436-6445
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-5.
- Lee, M.G., Hassani, O.K., Alonso, A. und Jones, B.E. (2005): Cholinergic basal forebrain neuron burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci.* **25**, 4365-4369.
- Lester, D.B., Rogers, T.D. und Blaha, C.D. (2010): Acetylcholine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther.* **16**, 137-62.
- Lenz, G., Gottfried, C., Luo, Z., Avruch, J., Rodnight, R., Nie, W.J., Kang, Y. und Neary, J.T. (2000): P(2Y) purinoceptor subtypes recruit different MEK activators in astrocytes. *Br J Pharmacol.* **129**, 927.

- Leon, C., Freund, M., Latchoumanin, O., Farret, A., Petit, P., Cazenave, J.P., Gachet, C. (2005): The P2Y₁ receptor is involved in the maintenance of glucose homeostasis and in insulin secretion in mice. *Purinergic Signal*. **1**, 145-151.
- Leon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J.P. und Gachet, C. (1999): Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y₁ receptor-null mice. *J Clin Invest*. **104**, 1731.
- Lin, J.H., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., Nunes, M., Goldman, S.A. und Nedergaard, M. (2007): Purinergic signalling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev Biol*. **302**, 356-366.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.
- Lucas-Meunier, E., Fossier, P., Baux, G. und Amar, M. (2003): Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch*. **446**, 17-29.
- Matos, J.E., Robaye, B., Boeynaems, J.M., Beauwens, R. und Leipziger, J. (2005): K⁺ secretion activated by luminal P2Y₂ and P2Y₄ receptors in mouse colon. *J Physiol* **564**, 269-279.
- Martens, U., Capito, B. und Wree, A. (1998): Septotemporal distribution of [³H]-MK-801, [³H]-AMPA and [³H]-kainate binding sites in the rat hippocampus. *Anat Embryol (Berl)*. **198**, 195-204.
- Martinez-Murillo, R. und Rodrigo, J. (1995): The localization of cholinergic neurons and markers in the CNS. In: Stone TW (ed) CNS Neurotransmitters and neuromodulators: Acetylcholine. *CRC Press, Boca Raton*, 1-38.
- McKinney, M. (2005): Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease. *Biochem Pharmacol*. **70**, 1115-1124.
- Mishra, S.K., Braun, N., Shukla, V., Fullgrabe, M., Schomerus, C., Korf, H.W., Gachet, C., Ikehara, Y., Seigny, J., Robson, S.C. und Zimmermann, H. (2006): Extracellular nucleotide signalling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development*. **133**, 675-684.
- Moore, D.J., Chambers, J.K., Murdock, P.R. und Emson, P.C. (2002): Human Ntera-2/D1 neuronal progenitor cells endogenously express a functional P2Y₁ receptor. *Neuropharmacology*. **43**, 966.
- Moore, D.J., Chambers, J.K., Wahlin, J.P., Tan, K.B., Moore, G.B., Jenkins, O., Emson, P.C. und Murdock, P.R. (2001): Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochem Biophys Acta*. **1521**, 107.

- Moore, D., Chambers, J., Waldvogel, H., Faull, R. und Emson, P. (2000): Regional and cellular distribution of the P2Y₁ purinergic receptor in the human brain: striking neuronal localisation. *J Comp Neurol.* **421**, 374-84.
- Moran-Jimenez, M.J. und Matute, C. (2000): Immunohistochemical localization of the P2Y₁ purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res.* **78**, 50.
- Mufson, E.J., Ma, S.Y., Dills, J., Cochran, E.J., Leurgans, S., Wu, J., Bennett, D.A., Jaffar, S., Gilmore, M.L., Levey, A.I. und Kordower, J.H. (2002): Loss of basal forebrain P75(NTR) immunoreactivity in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol.* **443**, 136-153.
- Neary, J.T., Kang, Y., Willoughby, K.A. und Ellis, E.F. (2003): Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J Neurosci.* **23**, 2348-2356.
- Neary, J.T., Whittemore, S.R., Zhu, Q. und Norenberg, M.D. (1994): Synergistic activation of DNA synthesis in astrocytes by fibroblast growth factors and extracellular ATP. *J Neurochem.* **63**, 490.
- Neary, J.T. und Zhu, Q. (1994): Signaling by ATP receptors in astrocytes. *Neuroreport.* **5**, 1617.
- Olney, J.W., Wozniak, D.F. und Farber, N.B. (1997): Excitotoxic neurodegeneration in Alzheimer disease. New hypothesis and new therapeutic strategies. *Arch Neurol.* **54**, 1234-40.
- Olschowka, J.A. und Vijayan, V.K. (1980): Postnatal development of cholinergic neurotransmitter enzymes in the mouse cerebellum. Biochemical, light microscopic and electron microscopic cytochemical investigations. *J Comp Neurol.* **191**, 77-101.
- Paglia, D.E. und Valentine, W.N. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* **70**, 158-69.
- Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., DeForge, S., Costello, P. und Del Maestro, R.F. (1992): *In Vitro Cell Dev Biol.* **28**, 529.
- Ridnour, L.A., Sim, J.E., Hayward, M.A., Wink, D.A., Martin, S.M., Buettner, G.R. und Spitz, D.R. (2000): A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media. *Anal Biochem.* **281**, 223-9.
- Robaye, B., Ghanem, E., Wilkin, F., Fokan, D., Van Driessche W., Schurmans, S., Boeynaems, J.M. und Beauwens, R. (2003): Loss of nucleotide regulation of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y₄-null mice. *Mol Pharmacol.* **63**, 777-783.

- Rodrigues, R.J., Almeida, T., Richardson, P.J., Oliveira, C.R. und Cunha, R.A. (2005): Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X₁, P2Y_{2/3}, P2X₃ and inhibitory P2Y₁, P2Y₂, and/or P2Y₄ receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci.* **25**, 6286-6295.
- Ruan, H.Z. und Burnstock, G. (2003): Localisation of P2Y₁ and P2Y₄ receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem Cell Biol.* **120**, 415.
- Saitow, F., Murakoshi, T., Suzuki, H. und Konishi, S. (2005): Metabotropic P2Y purinoceptor-mediated presynaptic and postsynaptic enhancement of cerebellar GABAergic Transmission. *J Neurosci.* **25**, 2108-2116.
- Sanada, M., Yasuda, H., Omatsu-Kanbe, M., Sango, K., Isono, T., Matsuura, H. und Kikkawa, R. (2002): Increase in the intracellular Ca(2+) and calcitonin gene-related peptide release through metabotropic P2Y receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **111**, 413.
- Sak, K. und Webb, T.E. (2002): A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Arch Biochem Biophys.* **397**, 131.
- Sasaki, Y., Hoshi, M., Akazawa, C., Nakamura, Y., Tsuzuki, H., Inoue, K. und Kohsaka, S. (2003): Selective expression of G_{i/o}-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia.* **44**, 242-250.
- Sato, A., Sato, Y. und Uchida, S. (2004): Activation of the intracerebral cholinergic nerve fibres originating in the basal forebrain increases regional cerebral blood flow in the rat's cortex and hippocampus. *Neurosci Lett.* **361**, 90-93.
- Schliebs, R. und Bigl, V. (1996): Animal models to produce cortical cholinergic dysfunction. In: Conn P.M., Perez-Polo, J.R. (eds) Methods in neurosciences. Vol. 30. Paradigms of neural injury. *Academ Press San Diego.* **275-289**.
- Schliebs, R., Roßner, S. und Bigl, V. (1996): Immunolesion by 192IgG-saporin of rat basal forebrain cholinergic system – a useful tool to produce cortical cholinergic dysfunction. *Progr Brain Res.* **109**, 253-264.
- Seidel, B., Bigl, M., Franke, H., Kittner, H., Kiess, W., Illes, P. und Krügel, U. (2006): Expression of purinergic receptors in the hypothalamus of the rat is modified by reduced food availability. *Brain Res.* **1089**, 143-52.
- Selkoe, D.J., Yamazaki, T., Citron, M., Podlisny, M.B., Koo, E.H., Teplow, D.B. und Haass, C. (1996): The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci.* **777**, 57-64.
- Sergeeva, O.A., Klyuch, B.P., Fleischer, W., Eriksson, K., Korotkova, T.M., Siebler, M. und Haas, H.L. (2006): P2Y receptor-mediated excitation in the posterior hypothalamus. *Eur J Neurosci.* **24**, 1413-1426.

- Shinozaki, Y., Koizumi, S., Ishida, S., Sawada, J., Ohno, Y. und Inoue, K. (2005): Cytoprotection against oxidative stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y₁ receptors. *Glia*. **49**, 288-300.
- Simon, J., Webb, T.E. und Barnard, E.A. (1997): Distribution of (35S) dATP alpha S binding sites in the adult rat neuraxis. *Neuropharmacology*. **36**, 1243.
- Siow, N.L., Xie, H.Q., Choi, R.C. und Tsim, K.W. (2005): ATP induces the postsynaptic gene expression in neuron-neuron synapses: transcriptional regulation of AChE catalytic subunit. *Chem Biol Interact*. 157-158: 423-426.
- Sparks, D.L., Beach, T.G. und Lukas, R.J. (1998): Immunohistochemical localization of nicotinic beta2 and alpha4 receptor subunits in normal human brain and individuals with Lewy body and Alzheimer's disease: preliminary observations. *Neurosci Lett*. **256**, 151-4.
- Surmeier, D.J., Ding, J., Day, M., Wang, Z. und Shen, W. (2007): D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*. **30**, 228-35.
- Takuma, K., Baba, A. und Matsuda, T. (2004): Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol*. **72**, 111-27.
- Tani, Y., Saito, K., Tsuneyoshi, A., Imoto, M. und Ohno, T. (1997): Nicotinic acetylcholine receptor (nACh-R) agonist-induced changes in brain monoamine turnover in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. **129**, 225-32.
- Toth, K., Borhegyi, Z. und Freund, T.F. (1993): Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *J Neurosci*. **13**, 3712-3724.
- Tran, M.D. (2011): P2 receptor stimulation induces amyloid precursor protein production and secretion in rat cortical astrocytes. *Neurosci Lett*. **492**, 155-9.
- van den Pol, A.N., Finbeiner, S.M. und Cornell-Bell, A.H. (1992): Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia in vitro. *J Neurosci*. **12**, 2648-64.
- Verkhratsky, A., Krishtal, O.A. und Burnstock, G. (2009): Purinoceptors on Neuroglia. *Mol Neurobiol*. **39**, 190-208.
- Verkhratsky, A. und Toescu, E.C. (2006): Neuronal-glial networks as substrate for CNS integration. *J Cell Mol Med*. **10**, 826-836.
- Volonte, C., Amadio, S., D'Ambrosi, N., Colpi, M. und Burnstock, G. (2006): P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol Ther*. **112**, 264.
- Volonte, C., Amadio, S., Cavaliere, F., D'Ambrosi, N., Vacca, F. und Bernardi, G. (2003): Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. **2**, 403.

- Walaas, I. und Fonnum, F. (1978): The effect of parenteral glutamate treatment on the localization of neurotransmitters in the mediobasal hypothalamus. *Brain Res.* **153**, 549-62.
- Ward, M.M. und Fletcher, E.L. (2009): Subsets of retinal neurons and glia express P2Y₁ receptors. *Neurosci.* **160**, 555-160.
- Webb, T.E., Simon, J., Krishek, B.J., Bateson, A.N., Smart, T.G., King, B.F., Burnstock, G. und Barnard, E.A. (1993): Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Letters.* **324**, 219.
- Wenk, G.L., Walker, L.C., Price, D.L. und Cork, L.C. (1991): Loss of NMDA, but not GABA-A, binding in the brains of aged rats and monkeys. *Neurobiol Aging.* **12**, 93-98.
- Widman, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. und Johnson, G.L. (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* **79**, 143.
- Wieraszko, A. (1996): Extracellular ATP as a neurotransmitter: its role in synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Neurobiol Exp.* **56**, 637-648.
- Woolf, N.J. (1991): Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol.* **37**, 475-524.
- Zhang, X. (2004): Cholinergic activity and amyloid precursor protein processing in aging and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* **3**, 137-152.
- Zimmermann, H. (2006a): Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp.* **276**, 113.
- Zimmermann, H. (2006b): Nucleotide signalling in nervous system development. *Pflugers Arch.* **452**, 479-485.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....
Datum

.....
Laura A. Vogt

Danksagung

Ich danke meinen Betreuern, Frau Dr. U. Krügel und Prof. Dr. R. Schliebs, für die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei Fragen, während der Bearbeitung des Themas, die hervorragende Beratung bei der Anfertigung der Promotionsschrift sowie die Korrektur des Manuskriptes.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Schaefer und Prof. Dr. T. Arendt bedanke ich mich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie und am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung anfertigen zu können.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Paul-Flechsig-Instituts, insbesondere Frau R. Jendrek für die hervorragende und herzliche Betreuung bei den Versuchsdurchführungen, die Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen und das sehr freundliche Arbeitsklima.

Mein Dank gilt darüber hinaus meiner Familie und Freunden für die Geduld und den Zuspruch, während der Entstehung der Arbeit.

